

**HEMMUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN AGGREGATION
MENSCHLICHER THROMBOZYTEN DURCH SYNTHETISCHE
FIBRINOLYTIKA**

**PHOTOMETRISCHE, LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN**

von

Detlev G. S. Thilo

aus

Erlangen

Aus der Abteilung für Blutgerinnung
des Universitätskrankenhauses Denver, Colorado, USA
Vorstand: Professor Dr. med. K. N. von Kaulla

HEMMUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN AGGREGATION MENSCHLICHER THROMBOZYTEN DURCH SYNTHETISCHE FIBRINOLYTIKA

**PHOTOMETRISCHE, LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE
UNTERSUCHUNGEN**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Detlev G. S. Thilo
aus
Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Auf der Abteilung für Blutbildung
des Universitätsklinikums Erlangen, Coburgerstr. 123A
Vorsandt: Professor Dr. med. K. N. von Eschke

HEIMUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTE AGGREGATION
MENSCHLICHER THROMBOCYTEN DURCH SYNTHETISCHE
PERINOLYTIN
RHEOMETRISCHE, LICHT- UND ELEKTROKINETISCHE
UNTERSUCHUNGEN

habituell - Dissertation
im Fachgebiet der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. med. Koch
Referent: Priv.-Doz. Dr. Schrickner
Tag der mündlichen Prüfung: 24. 2. 1972

Erlangen

An dieser Stelle sei Professor Dr. med. F. Scheiffarth für die freundliche Hilfe bei der ersten Übernahme meiner Dissertation sehr herzlich gedankt, sowie für den Rat und die Genehmigung zur Einholung eines Gutachtens über diese Dissertation bei Prof. Dr. R. MARX, I. med. Klinik, München.

Besonders möchte ich mich bei Professor Dr. med. K. N. von Kaulla, Denver/USA, für die zahlreichen Anregungen zu diesem selbstgewählten Thema, die großzügige finanzielle Unterstützung und die sehr große Mühe und Leitung herzlich bedanken.

Für die wertvollen Anregungen sei Professor Dr. N. Aoki Ph.D., Denver, und Frau E. von Kaulla, Denver, für die Hilfestellung bei den Experimenten L. Lepple B.S. und D. Foglman, Denver, und für die Anleitung in der Statistik Dr. Archer Ph.D., Dank gesagt.

Mein großer Dank gilt ebenso Professor Dr. J.P. Lodge Ph.D., National Center for Atmospheric Research, Boulder, Colorado, USA, für die großzügige Überlassung seines Elektronenmikroskopes, sowie Fräulein E. Frank B.S. für die ausgezeichnete Einführung in die Elektronenmikroskopie.

Zum Schluß möchte ich meinen besonderen Dank der Medizinischen Fakultät, Erlangen, und Frau U. Leonhardt, Leiterin des Akademischen Auslandsamtes der Universität Erlangen, dafür aussprechen, daß sie mich zu diesem Forschungsjahresstipendium vorschlugen und ausgewählt hatten.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
Problemstellung	1
A. EINLEITUNG	2
1. Entdeckung und Funktion der Thrombozyten	2
2. Thrombozytenaggregation	7
a. Kollagen und Thrombozyten	7
b. "release reaction" der Thrombozyten	8
c. Adenosindiphosphat und Thrombozyten	9
d. Thrombin und Thrombozyten	9
e. Fibrinogen und Thrombozyten	10
f. andere Faktoren bei der Thrombozyten- aggregation	11
g. Blutgerinnungssystem und Aggregation	11
3. Thrombozytenaggregationstheorien	11
4. Bemerkungen zum fibrinolytischen System	15
5. Thrombolysen und Fibrinolyse	17
6. Synthetische Fibrinolytika	18
B. MATERIAL UND METHODEN	20
1. Fibrinolytische Aktivität der synthetischen Verbindungen	20
2. Bezugsquellen für die synthetischen Fibrinolytika	22
3. Thrombozytenaggregationsmessung	22
4. Apparatur	23
5. Vorbereitung der Versuche	24
a. Silikonisierung	24
b. Blutentnahme	25
c. Herstellung der Natriumsalze der Fibrinolytika	26
d. Kollagensuspensionsherstellung	26
6. Chemikalien	27
7. Messung der Aggregationshemmung durch die Fibrinolytika	27

a. Einstellung der Maschine	27
b. Versuchsansatz	28
8. Berechnung der Aggregationskurven	30
9. Thrombozytenzählung	31
10. pH-Wertmessung der Thrombozytensuspension vor und nach der Aggregation	31
11. Statistik	31
12. Lichtmikroskopische Untersuchungen	33
13. Vorbereitungen und Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop	33
C. ERGEBNISSE	35
1. Literaturnachforschungen	35
2. Kontrollexperimente	35
a. Einfluß der Thrombozytenzahl auf die Aggregationshöhe	35
b. pH-Messungen	36
c. Statistische Berechnungen der Kontrollwerte	38
3. Inkubationszeit des TRP mit Fibrinolytika	40
4. Vorinkubierung der Kollagensuspension mit Fibrinolytika	41
5. Lichttransmission und Thrombozytenaggregate	41
6. Neue Methode zur Differenzierung zwischen Aggregaten entstanden bei Kontroll- und Fibrinolytika-Experimenten	46
7. Grenzen der photometrischen Registrier- Methode nach Born	48
8. Reproduzierbarkeit der photometrischen Methode nach BORN bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation	51
9. Chemische Struktur der Fibrinolytika in Bezie- hung zu der durch sie bewirkten Aggregations- hemmung	54
10. Einfluß der Fibrinolytika auf die Latenz- periode	62
11. Einfluß der Fibrinolytika auf die Desaggregation	62
12. Einfluß der Fibrinolytika auf die Endotoxin-indu- zierte Thrombozytenaggregation	63

13. Einfluß der Fibrinolytika auf die Ultrastruktur der Thrombozyten vor und nach der Kollagen- induzierten Aggregation	64
D. DISKUSSION	74
E. ZUSAMMENFASSUNG	83
F. ANHANG	84
1. Tabelle 4 Kontrollwerte der Latenzperiode	84
2. Tabelle 5 Kontrollwerte der maximalen Deflektion	86
3. Tabelle 6 Kontrollwerte der Aggregationshöhe	88
4. Tabelle 7 Ergebnisse der Aggregationshemmung durch Anthranilsäure und ihre Derivate	90
5. Tabelle 8 Ergebnisse der Aggregationshemmung durch Salicylsäure und ihre Derivate	92
6. Tabelle 9 Ergebnisse der Aggregationshemmung durch Thiophen-3-carbonsäure und ihre Derivate	94
7. Tabelle 10 Ergebnisse der Aggregationshemmung durch verschiedene Fibrinolytika	96
8. Tabelle 11 Literaturnachforschungen über die Herstellung und Aufbewahrung der Thrombozyten- und Kollagensuspension sowie verschiedene Aggre- gationsmessmethoden	98
G. LITERATURVERZEICHNIS	116

Problemstellung

Thrombose ist heute noch eine der gefürchtesten Komplikationen in der Medizin.

Auf der Suche nach geeigneten, oral und prophylaktisch verabreichbaren, billig herstellbaren Thrombolytika wurden die synthetischen Fibrinolytika entwickelt, die einen Teil der Forderungen an solch ein ideales Medikament erfüllen.

Da Kollagen eine bedeutende Rolle in der Thrombogenese und damit bei der Thrombozytenaggregation spielt, wurde die Frage untersucht, inwieweit diese Fibrinolytika die Kollagen-induzierte Aggregation menschlicher Thrombozyten in vitro zu hemmen vermögen.

Die Thrombozytenaggregationshemmung wurde mit der photometrischen Methode nach BORN gemessen und durch fibrinolytische, licht- und elektronenmikroskopische Ergebnisse ergänzt.

A. EINLEITUNG

1. Entdeckung und Funktion der Thrombozyten

Nach LAKER (1889, 77) kann die Entdeckung der Thrombozyten, ihre Rolle und Bedeutung in der Blutgerinnung sowie Thrombosebildung in vier Perioden unterteilt werden.

Die erste Forschungsperiode beginnt mit den wenig bekannten Beobachtungen zweier englischer Ärzte, die unabhängig voneinander die Existenz von farblosen Korpuskeln im Blut beschrieben. Um 1840 wurden von GULLIVER und ADDISON die ersten Zeichnungen von Thrombozyten veröffentlicht (ROBB-SMITH 1967, 122).

Jedoch wird DONNÉ (1842, 32) immer wieder als Erster genannt, die Existenz der Thrombozyten entdeckt zu haben. In seinen mikroskopischen Beobachtungen fand der Autor im menschlichen Blut neben den roten und weißen Zellen noch kleine "Globuline", die sich von den Leukozyten und Erythrozyten unterscheiden.

Im Jahre 1846 beschrieb ZIMMERMANN diese neuen Körperchen als "Elementarbläschen" und bemerkte auch ihre Fähigkeit, aneinander kleben zu bleiben.

SCHULTZE (1865, 127) unternahm den ersten Versuch, den Ursprung dieses neuen Blutelementes zu erforschen. In seinen Experimenten beobachtete er in normalen Blutgefäßen Zellen, denen er eine protoplasmatische Herkunft zuschrieb, und bemerkte ihre Fähigkeit zu aggregieren und kleine "Kugeln" zu bilden. Schultze bestritt jedoch, daß seine "Elemente" mit den Zimmermann'schen Elementarbläschen identisch seien. In der granulierten Masse sah er sich durchziehende Fäden, die nach seiner Meinung nicht eine Verlängerung der Masse selbst, sondern geronnener Faserstoff sein mußten.

VULPIAN beschrieb im Jahre 1873 ähnliche farblose Korpuskeln im Blut. Im selben Jahr erwähnte RANVIER (119) leicht gefärbte Granulationen, die während der Blutgerinnung im Zentrum des fibrinösen Netzwerkes erscheinen, sich aber von allen anderen Zellen in die-

sem Netzwerk unterscheiden würden. RANVIER stellte daher die Theorie auf, daß diese Masse wahrscheinlich die Blutgerinnung in der gleichen Art und Weise beenden würde wie ein Salzkristall die Auskristallisation einer saturierten Salzlösung herbeibringt. OSLER (1874, 113) belegte dann durch seine Zeichnungen, daß die "granulierten Massen" von Schultze als einzelne Einheiten im Blut vorkommen würden.

Mit der Veröffentlichung von HAYEM (1878, 54) begann der zweite Forschungsabschnitt. Er sah in diesen Korpuskeln nichts weiter als primitive Blutzellen, die über ein bestimmtes Entwicklungsstadium nicht hinausgekommen waren und nannte sie daher "Hemoblasten". Ihnen gab HAYEM eine doppelte Funktion, da sie eine Rolle bei der Regeneration des Blutes spielen und als blutgerinnungsbeschleunigende Substanzen wirken. Dieser Autor fertigte auch die erste genaue Thrombozytenzählung an, obwohl RIESS 1872 dies bereits versucht hatte. Hayems Beschreibung nach haben diese Hemoblasten eine bikonkave Form, sind gelblich, rund, ca. 1-5 Mikron groß und besitzen eigenartige physikalische und chemische Eigenschaften.

Nach Laker gilt das Jahr 1882 als dritte Periode, da BIZZOZERO (9) bestätigte, daß diese Zellen als selbständige Einheiten im Blut vorkommen würden. Durch Beobachtungen am zirkulierenden Blut lebender Tiere gab Bizzozero ihnen den Namen "Blutplättchen" auf Grund ihrer Erscheinungsform unter dem Mikroskop. Der Autor bezeichnete diese Zellen als den integrierenden Faktor bei der Blutgerinnung. In seiner Arbeit widerlegte er die allgemeine Auffassung über die Thromboseentstehung und gab den Plättchen die Hauptrolle in dieser Formation (9, S. 292).

Zu seiner Zeit glaubte man, daß der Thrombus aus weißen Blutzellen und Leukozyten (ZAHN 1875, 162, S. 83) geformt wird.

Nach Ergebnissen von Bizzozero können die Plättchen sich in Haufen zusammenballen und verändern so ihre Struktur und Erscheinungsform. Dieser Vorgang wurde später von EBERTH, SCHIM-

MELBUSCH (1886, 35, S. 66) als "visköse Metamorphose" bezeichnet.

Im Jahre 1882 betonte HAYEM (52, 53) nochmals die Bedeutung der Thrombozyten bei der Thrombusformation und berichtete, daß eine Verminderung der Anzahl oder Abwesenheit der Plättchen eine Unterbrechung der Hämostase mit sich bringt.

Der nächste Abschnitt wird gekennzeichnet durch die starke Opposition gegen Bizzozeros Ergebnisse und alle die, die an das dritte Element im Blute glaubten. Erst 1885 durch EBERTH und SCHIMMELBUSCH (34) und durch LAKER (1889, 77) konnte die Existenz der Plättchen durch Färben und Beobachtungen am zirkulierenden Blut eindeutig bestätigt werden.

Der Ursprung der Thrombozyten blieb jedoch unbekannt. 1900 erwähnte DOMINICI (31), daß die Plättchen aus den abgebrochenen Fortsätzen mononuklearer Zellen mit Protoplasma entstehen würden. DEETJEN (1901, 26) glaubte durch seine Osmiumfixation gezeigt zu haben, daß die Plättchen protoplasmatische Fortsätze, ähnlich den Pseudopodien der Leukozyten aussenden würden. Der Name "Thrombozyt" wurde 1901 von DECKHUYSEN (27) geprägt und WRIGHT (1906, 161) berichtete, daß die Plättchen aus den von HOWELL (1891) benannten Megakaryozyten des Knochenmarkes entstehen würden.

OGATA (1912, 112) und SEELIGER (1923, 129) bestätigten die Befunde von Wright durch Experimente am Knochenmarkmegakaryozyten, sowie am embryonalen Blutbildungssystem.

1901 zeigte DUKE nochmals die Rolle der Thrombozyten in der spontanen Hämostase auf, indem er die Blutungszeit der Haut als einen Test für die allgemeine Tendenz zum Bluten vorschlug, da eine enge Beziehung zwischen der Anzahl der Thrombozyten im Blut und der Dauer der Blutungszeit besteht. TOCANTINS (1948, 146) schrieb über ihn:

"Duke was responsible, perhaps more than any other contemporary author, for strengthening the concept

of the role and importance of platelets in disease disorders of hemostasis".⁺

Durch die Beschreibung der Thrombozyten als "Stoffwechselriesenzellen" durch MAROWITZ und LUEBER 1921 begann die biochemische Erforschung der Thrombozyten. Im Jahre 1923 prägte ROSKAM (124) das Wort "atmosphere plasmatique periplaquettaire" als Beschreibung für ein aus Plasmaproteinen bestehendes Mileau auf und um den Thrombozyten.

Ein vollkommen neuer Abschnitt in der Thrombozytenforschung begann mit den ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von WOLPERS und RUSKA (1939, 160). Weitere Ergebnisse kamen in schneller Folge. Nach LÜSCHER (1968, 83) zeigten BIGGS, DOUGLAS und MACFARLANE 1953 "über jeden Zweifel erhaben", daß die Thrombozyten einen wesentlichen Teil der intrinsic Prothrombinaktivierung sind. Er schreibt weiter:

"This ended a period of several decades during which many, if not most research workers had disregarded completely the role of the platelet in blood coagulation and in hemostasis".⁺⁺

SCHULZ, JÜRGENS und HIEPLER (1958, 128) stellten dann eine Nomenklatur für die Ultrastruktur der Thrombozyten auf, BETTEX-GALLAND und LÜSCHER (1959, 8) isolierten ein kontraktiles Thrombozytenprotein, das sie "Thrombosthenin" nannten und dem dann SALZMAN et al. (1966, 126) eine Adenosintriphosphatase-Aktivität zuschrieben. 1960 fand SALMON (125) Plasmaproteine auf der Plättchenmembran absorbiert, wo auch von IASTRIDIS und FERGUSON (1965, 64) ein "surface factor" (Oberflächenfaktor) gefunden wurde.

⁺) "Duke war dafür verantwortlich und wahrscheinlich mehr als irgendein anderer zeitgenössischer Autor, daß das Wissen und die Theorie über die Rolle und Wichtigkeit der Plättchen in Blutgerinnungsstörungen gefestigt wurde."

⁺⁺) "Dies beendet eine Zeit von einigen Jahrzehnten, in der viele, wenn nicht fast alle Forscher vollkommen die Rolle des Thrombozyten in der Blutgerinnung und Hämostase vernachlässigt haben".

Ein bedeutender Fortschritt gelang dann HELLEM (1960, 55) in der Aufschlüsselung der Thrombozytenaggregation durch Beschreibung eines auslösenden Faktors "R". GAARDER et al. (1961, 39) identifizierten diesen als Adenosindiphosphat, der bei der Thrombozytenadhäsion freigesetzt wird. HUGUES (1960, 62) und BOUNAMEAUX (1959, 16) fanden die aggregationsinduzierende Wirkung des Kollagens, die auf einer Freisetzung von Adenosindiphosphat aus den Thrombozyten beruht (HOVIG 1963, 60).

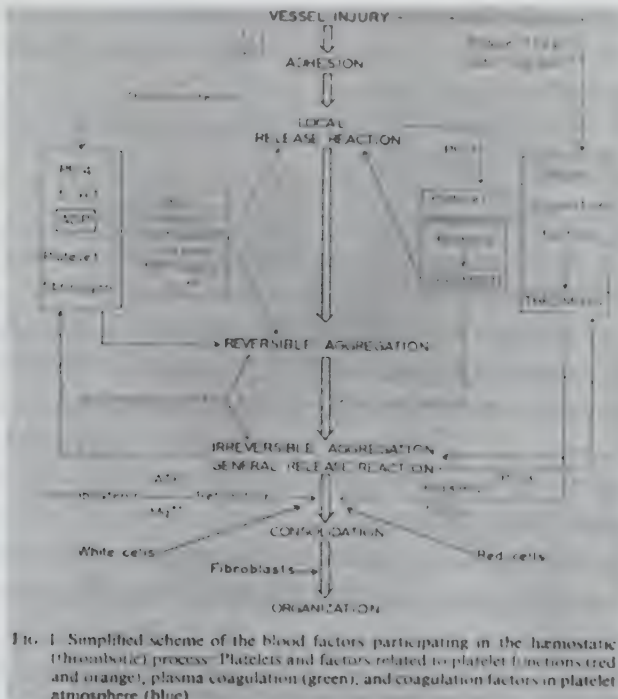


Fig. 1. Simplified scheme of the blood factors participating in the hemostatic (thrombotic) process. Platelets and factors related to platelet functions (red and orange), plasma coagulation (green), and coagulation factors in platelet atmosphere (blue).

Abb. 1

Vereinfachtes Schema von Blutfaktoren, die sich am hämostatischen (thrombotischen) Prozeß beteiligen: Thrombozyten und Faktoren, verbunden mit der Thrombozytenfunktion (rot und orange), Plasma-koagulation- (grün) und Koagulationsfaktoren in der Thrombozyten-atmosphäre (blau) (entnommen aus POLLER 1969, 116).

Seit dieser Zeit häufen sich die Untersuchungen über den Mechanismus, sowie Verhinderung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation, da man immer mehr ihre Bedeutung in der Thrombusformation erkennt, und diese wiederum an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sein soll (DUGUID 1948, 33; MORE, HAUST 1961, 91; MORGAN 1956, 92).

2. Thrombozytenaggregation

Nach den heutigen Ergebnissen ist eine definitive Aussage über den exakten Mechanismus der Thrombozytenaggregation - sei sie ausgelöst durch Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Kollagen, Thrombin oder andere Substanzen - nicht möglich. Verschiedene Faktoren sollen sich an der Aggregation und ihrer Induktion beteiligen.

a. Kollagen und Thrombozyten

In vivo lagern sich die Thrombozyten innerhalb weniger Sekunden nach einem Trauma an den Wundrändern und in der Verletzungsstelle an (ZUCKER 1947, 163) und hier besonders an den Subendothelfasern (BOUNEMEAUX 1959, 16; HUGUES 1960, 63), die von KJAERHEIM und HOVIG (1962, 71) elektronenmikroskopisch als Kollagenfasern identifiziert wurden.

In vitro kann Thrombozyten-reiches-Plasma durch Kollagensuspension aggregiert werden (ZUCKER, BORRELLI 1962, 164), dessen Mechanismus HOVIG (1963, 58) als eine Freisetzung von Adenosindiphosphat aus den Thrombozyten und einer Zelldegranulierung bei anscheinend intakter Zellmembran beschrieb.

Weiterhin kann Kollagen die Thrombozytenfaktoren 3 (SPAET, CINTRON 1964, 139) und Faktor 4 (NIEWIAROWSKI et.al, 1968, 102) freisetzen, die für eine spätere Thrombusentwicklung von Bedeutung sind, wie aus Abb. 1 ersichtlich wird.

b. "release reaction" der Thrombozyten

Dieser Begriff wurde von GRETTE (1962, 42) geprägt und als eine Freisetzung von Substanzen aus den Thrombozyten definiert. Diese "release reaction" kann durch verschiedene Substanzen induziert werden wie z.B. durch Thrombin, das große Mengen von Adenosin-nukleotiden, Serotonin und kleiner Mengen von Aminosäuren, Proteinen und besonders Fibrinogen freisetzen kann. Diese Reaktion soll durch das kontraktile Protein "Thrombosthenin" gefördert werden.

Über den genauen Mechanismus besteht noch keine einheitliche Meinung, doch nimmt man an, daß diese Freisetzung von Thrombozyten-eigenen Substanzen nicht als ein allgemeiner Zusammenbruch der Zellmembran zu deuten ist. Hemmt man nämlich die Thrombozytenglykolyse und ihre oxydative Phosphorylierung, dann ergibt sich keine "release reaction". Damit ist nach MARKWARDT (1967, 86) und MÜRER (1968, 94) angezeigt, daß hier ein energie-gebundener Prozeß vorliegen muß.

Es wird keine Freisetzung von Plättchenkomponenten durch einfache Diffusion auf Grund veränderter Membranpermeabilität angenommen, sondern daß die Thrombozytengranula vielmehr aktiv zur Zellmembran vordringen, sich mit ihr vereinigen und dadurch ihre enthaltene Substanz freisetzen oder sie durch Kanäle ausstoßen (FRENCH, POOLE 1963, 38; LIBANSKA 1967, 80).

Durch Adenosindiphosphat wird nach MUSTARD et al. (1964, 96) und CASTALDI et al. (1965, 21) Plättchenfaktor 3 für das intrinsic-System der Blutgerinnung verfügbar gemacht. Dazu soll nach PIZZUTO et al. (1966, 115) Adenosindiphosphat eine direkte Wirkung auf die Plasmagerinnung besitzen.

c. Adenosindiphosphat und Thrombozyten

In vitro zugesetztes Adenosindiphosphat (ADP) besitzt die Fähigkeit, die Thrombozyten zu aggregieren (BORN 1962, 11; GAARDER et al. 1961, 39; HOVIG, HOLMSEN 1963, 60).

Durch verschiedene Substanzen (z. B. Thrombin, Kollagen) kann aus den Thrombozyten ADP freigesetzt werden, das dann die Aggregation einleitet.

HOLMSEN (1965, 56) und HOLMSEN et al. (1969, 57) postulierten auf Grund ihrer Versuchsergebnisse drei Nukleotid-"pools" (Nukleotidsammelstellen) in den Thrombozyten mit verschiedenen Funktionen. Der erste enthält 60 % der Gesamt-ATP-ADP-Menge, beteiligt sich nicht am Stoffwechsel der Thrombozyten, ist in bestimmten zellulären Zellstrukturen anzutreffen und wird direkt freigesetzt.

Der zweite (10 % der Gesamt-ATP-ADP-Menge) besteht wahrscheinlich ausschließlich aus ATP (Adenosintriphosphat), wird intrazellulär verbraucht und wahrscheinlich direkt zu IMP (Inosinmonophosphat) umgewandelt.

Der dritte soll aus ca. 30 % der Gesamt-ATP-ADP-Menge bestehen, in dem Zytoplasma, den Mitochondrien und der Zellmembran enthalten sein. Er bleibt unverändert und nach Aussage der Autoren soll zwischen dem zweiten und dem dritten Pool ein Equilibrium bestehen.

Kollagen setzt aus dem ersten Pool ADP und ATP frei, das nicht durch P^{32} -, C^{14} -Adenosin oder durch C^{14} -Adenin in vitro markiert werden kann. Es läßt 50 % der Gesamtmenge von ATP-ADP in den Thrombozyten zurück.

d. Thrombin und Thrombozyten

Auch über die Wirkungsweise des Thrombins bei der Thrombozytenaggregation besteht keine Klarheit. Verschiedene Autoren nehmen

an, daß die Thrombin-induzierte Aggregation durch eine ADP-Freisetzung aus den Thrombozyten zustandekommt (HASLAM 1964, 50; O'BRIEN 1963, 108).

NIEWIAROWSKI und THOMAS (1966, 100) dagegen behaupten, daß die aggregationsinduzierende Wirkung des Thrombins nicht allein auf der ADP-Freisetzung beruht und schlagen daher vor, daß ADP die Thrombinreaktion potenziert.

Es wäre daher möglich, daß Thrombin die physiochemischen Eigenschaften der Thrombozytenmembran verändert, indem es vielleicht an spezifischen, nicht-fibrinogenen Membranrezeptoren wirkt (NACHMAN 1968, 98).

e. Fibrinogen und Thrombozyten

Fibrinogen wird immer wieder als Teilfaktor für die Thrombozytenaggregation diskutiert. CROSS (1964, 24) beschrieb Fibrinogen als Cofaktor für die ADP-induzierte Aggregation gewaschener Thrombozyten. BORN (1965, 12; 1967, 13) schlägt in seiner Theorie vor, daß die ADP-Moleküle die Thrombozytenmembran so verändern, daß diese die Fähigkeit erhält, mit dem Fibrinogen Verbindungen eingehen zu können. Daher läßt sich nach CASTALDI, CAEN (1965, 20) Fibrinogen für die ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten nicht vernachlässigen.

Nach GRETTE (1962, 42) kann Thrombin und Trypsin intrazelluläres Fibrinogen freisetzen, während nach SOLUM und STROMORKEN (1965, 137) externes Fibrinogen für die Thrombin- und Kollagen-induzierte Aggregation gewaschener, normaler Thrombozyten, suspendiert in hitzeinaktiviertem Plasma, nicht notwendig zu sein scheint. Dieses steht nach ihren Versuchsergebnissen im Gegensatz zu der ADP- und Adrenalin-induzierten Aggregation.

f. Andere Faktoren bei der Thrombozytenaggregation

Als weitere sich an der Thrombozytenaggregation beteiligende Faktoren werden noch ein "Anti-bleeding"- oder "Anti-von-Willebrand"-Faktor (NILSSON et al. 1957, 103) diskutiert, der im Serum sowie im Plasma vorkommt (STORMORKEN 1967, 143), ein "transferable"-Faktor (HAMPTON, MITCHELL 1966, 45), sowie wird eine Beteiligung der Erythrozyten und Leukozyten, da die letzteren besonders reich an ATP-spaltenden Fermenten sind, angenommen.

g. Blutgerinnungssystem und Aggregation

Der auslösende Faktor des intrinsic-Systems ist unbekannt, könnte aber nach NIEWIAROWSKI et al. (1965, 99) in einer Aktivierung des Faktors XII durch Kollagen liegen.

Für das extrinsic-System wird eine Aktivierung durch Gewebsthromboplastin diskutiert.

Sollten die erwähnten auslösenden Faktoren nicht vorhanden sein, kann über den aktivierenden Faktor XII nach VII immer noch eine Thrombinbildung erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit der Aktivierung und der Aggregationsauflösung ist die Freisetzung von Substanzen aus den Gefäßwänden, durch Hämolyse und Erythrozyten oder durch die "release reaction" aus den Thrombozyten, die den Faktor XI auch direkt aktivieren können.

3. Thrombozytenaggregationstheorien

Es folgt eine Zusammenstellung der Aggregationstheorien, die die Komplexität des ersten Schrittes der Thrombusbildung verdeutlichen, sowie für eine spätere, eigene Theorienbildung behilflich sein soll.

(1) BOOYSE, RAFELSON (1969, 10)

- a) Ein nahe oder an der Oberfläche, der Umgebung ausgesetztes, lokalisiertes, aktinmyosin-ähnliches Protein katalysiert die Spaltung von ATP zu ADP und Phosphorsäure. Die Konzentration von verfügbarem Substrat (ATP) ist jedoch unterhalb der kritischen, notwendigen Konzentration, um den Aktinmyosinkomplex in seine Teile (in F-Aktin und Myosin) zu spalten.
- b) Unter dem Einfluß von physiologischen Stimuli (z. B. Thrombin, das die Glykolyse anregt) ist die Konzentration und Verfügbarkeit von ATP soweit erhöht, daß die Auflösung in F-Aktin und lineare Aggregate des Myosins herbeigeführt werden kann.
- c) In der dissoziierten Form ist die ATP-ase-Aktivität niedrig wie die vom Thrombozytenmyosin. Da sich die ATP-Konzentration durch die ATP-ase-Aktivität des Myosins vermindert, beginnt die Reassoziierung der Teile. Somit steigt die ATPase-Aktivität. Dies wird am Anstieg der Mg-ATPase (oder Ca-ATPase) des Thrombozytenaktinmyosinkomplexes sichtbar.
- d) Diese Formierung schließt nicht nur intermolekulare Reaktionen zwischen den Proteinteilen an dem einzelnen Thrombozyten, sondern auch zahlreiche intermolekulare Reaktionen zwischen F-Aktin und Myosin von benachbarten Plättchen mit ein. Diese intermolekularen Aktinmyosinbrücken haben die Fähigkeit, sich in Gegenwart von ATP (bei einer Konzentration niedriger als die für die Auflösung des Komplexes notwendig ist) zusammenzuziehen, und somit eine feste Thrombozytenmasse zu bilden.

(2) BORN, CROSS (1963, 14; 1964, 15)

Die Kalzium abhängige ADP-induzierte Aggregation ergibt sich durch Kalziumbrücken zwischen den ADP-Molekülen die an ganz bestimmten Stellen der Thrombozytenmembran absorbiert sind. Weiterhin ist ein hitzestabiler Plasmaproteinfaktor notwendig, der teilweise in der Euglobulinfraktion präzipitiert wird, sowie sich in den Präparationen für Faktor VIII finden läßt. (Eine Erweiterung dieser Theorie wird von SMINK et al. (1967, 134) vorgeschlagen, in der die Absorption eines Säure-Kalzium ADP-Komplexes diskutiert wird. Durch diesen Komplex wird Fibrinogen präzipitiert, durch das dann Brücken zwischen den Thrombozyten entstehen).

(3) BREDDIN (1968, 18)

Dieser Autor schlägt ein proteolytisches Ferment, "Aggregin" vor, das Ähnlichkeit mit Thrombin haben soll. Es kann Fibrinogen verändern, vielleicht auch die Thrombozytenmembran angreifen. Es wird angenommen, daß Aggregin Fibrinogen spalten kann; das entstandene Molekül ist kleiner als Fibrinogen, größer aber als Fibrinmonomer und polymerisiert wahrscheinlich zu noch löslichen Einheiten. Dieses abgewandelte Fibrinogen ist der eigentliche Thrombozytenaggregierende Faktor.

(4) DAVEY, LÜSCHER (1968, 25)

- a) Die Thrombozyten zirkulieren in einer kontrahierten Form, die durch das ATP-ase-Aktivität enthaltende, kontraktile Protein aufrechterhalten wird, sowie von der Stoffwechselaktivität der Zelle (Glykolyse, oxydative Phosphorylierung) abhängig ist.
- b) Das Einwirken von ADP hemmt die kontraktile Aktivität, ermöglicht die Entspannung. Es folgt dadurch die Aggregation. Thrombin setzt aus den Thrombozyten ADP frei, das nun erneut eingreifen kann.
- c) Für die Aggregation ist die Bindung externer Kalziumionen durch ein Thrombozytenmembranphospholipid, eine Modifikation von Proteinen, Absorption eines Plasmakomponenten und Verlust der vorher absorbierten Proteine erforderlich.
- d) Die Entspannung durch zugegebenes oder freigesetztes ADP nimmt ab. Es folgt die Zusammenziehung einzelner Thrombozyten und die Aggregate brechen ab.
- e) Die durch Thrombin hervorgerufene Entspannung nimmt ebenfalls ab. Da die Proteine aber bereits verändert sind, findet keine Verteilung der Aggregate statt, so daß nun stabile Proteinverbindungen von den Membranen vor sich gehen können.
- f) Das Aggregat kontrahiert sich als Ganzes. Im Gerinnsel hängt es an Fibrinfäden, wodurch die Gerinnselretraktion zustandekommt.

(5) GAARDER, LALAND (1964, 40)

Da die -6-amino-Gruppe und das N₁- des Adenins Tendenzen zur Wasserstoffbrückenbindung aufweisen, wird ADP dadurch an die Thrombozytenoberfläche gebunden. Die Aggregation herbeiführenden Nukleotide besitzen im physiologischen pH-Bereich eine ungerade Anzahl von Ladungen, während die Aggregationshemmer keine oder nur eine gerade Anzahl solcher Ladungen besitzen. Kalzium, notwendig für die Aggregation, wird mit einer doppelten negativen Ladung von den negativen Teilen des ADP-Moleküls angezogen. Somit werden die Nukleotide an die Thrombozytenoberfläche gebunden, ermöglichen Bildung neuer Kalziumionenbrücken zwischen den Zellen und fördern damit die Aggregation.

(6) KOLWALSKI et al. (1966, 75)

Die Autoren bringen in ihrer Theorie die Freisetzung von Adennukleotiden und die visköse Metamorphose von Thrombozyten mit einer Aktivierung der Thrombozytenlysosomen in Zusammenhang. Die Folge davon ist eine Veränderung im Stoffwechsel der Thrombozyten und eine Freisetzung von zelleigenen Substanzen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Theorie ist die Aktivierung der Thrombozyten-ATPase, wodurch ATP zerstört und ADP freigesetzt wird.

(7) NIEWIAROWSKI et al. (1968, 101, 102)

Der Thrombozytenfaktor 4, ein basisches Protein, wird durch ADP, Thrombin und Kollagen aus der Zellmembran freigesetzt. Dieser Faktor soll sich an den verschiedenen Arten der Aggregation durch Reaktion mit einem löslichen Fibrinmonomerkomplex und Fibrinogen in der Thrombozytenatmosphäre und besonders an der Oberfläche beteiligen. Die Moleküle des Faktors 4 sind zwar noch im Thrombozyten, doch so nahe an der Oberfläche, daß sie als potentielle Bindungsstellen für den parakoagulierten, löslichen Fibrinmonomerkomplex oder für das präzipitierte Fibrinogen in Frage kommen. Es scheint möglich zu sein, daß ein solcher Komplex zur Bindung zweier Thrombozyten ausreicht, jedoch große Komplexaggregate sind nicht auszuschießen.

In diesem Zusammenhang wird auch eine Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften der Thrombozyten durch die Freisetzung des Faktors 4 diskutiert.

(8) ROBINSON et al. (1965, 123)

Als auslösender Faktor für die Aggregationsinduktion wird in dieser Theorie eine gesteigerte Thrombozyten-ATPase-Aktivität angegeben, die ihrerseits zu einer Abnahme von membran-gebundenem ATP führt und dadurch eine Abnahme des Oberflächenpotentials der Thrombozyten bewirkt.

(9) SALZMAN et al. (1966, 126)

Die Zugabe von ADP zu Thrombozyten-reichem-Plasma verhindert die Spaltung von ATP in ADP, eine Reaktion, die sonst kontinuierlich an der Thrombozytenoberfläche abläuft. Diese Reaktion erbringt Energie für ein regulierendes Membransystem, das für die Erhaltung der Thrombozytengröße, Form und "Nicht-klebarkeit" erforderlich ist. Die Produkthemmung einer Ca/Mg -abhängigen Membran-ATPase durch ADP verändert die Thrombozytenoberfläche und erlaubt damit eine Brückenbildung zwischen benachbarten Thrombozyten. Diese Verbindungen sollen aus divalenten Kationen, Fibrinogen oder anderen Proteinen bestehen.

(10) SPAET, LEJNIEKS (1966, 142)

Die bei der Spaltung von ADP zu AMP und Phosphorsäure freierwerdende Energie wird für nicht identifizierbare Thrombozytenbindungsreaktionen verbraucht.

Bei Zugabe von ATP, ADP oder AMP ist eher eine Inkorporation dieser Substanzen in den Thrombozytenpool (Sammelstelle), als eine passive Anhaftung an die Thrombozytenoberfläche zu diskutieren.

4. Bemerkungen zum fibrinolytischen System

Wenden wir uns nun kurz der Fibrinolyse als wichtigstem Teil der Thrombolyse und als Grundlage zum besseren Verständnis der Wirkungsweise der organischen, synthetischen Fibrinolytika zu.

Der Name "Fibrinolyse" wurde 1893 von DASTRE geprägt. Er beobachtete damals, daß das Blut von Hunden in vitro zwar rasch gerinnt, sich aber bald wieder verflüssigt.

Die Fibrinolyse stellt ein präformiertes Blutsystem dar, welches

jederzeit aktiviert werden kann und imstande ist, Fibrin aufzulösen, ohne andere Eiweißkörper nennenswert anzugreifen.

Nach ASTRUP, STERNDOORFF (1953, 7) und anderen findet eine dauernde, latente Gerinnung in den Blutgefäßen statt, die mit einer immerwährenden Fibrinolyse als Wiederauflösung der Fibrinablagerungen an den Gefäßwänden verbunden ist. Somit stehen Blutgerinnung und Fibrinolyse in einem dynamischen Gleichgewicht. Die erste erzeugt Fibrin, die letztere ist die enzymatische Auflösung des Fibrins in seine Bruchstücke, die nicht mehr fähig sind, ein zusammenhängendes Netz zu bilden.

Die Blutgerinnung und Fibrinolyse zeigen Ähnlichkeiten in ihren Systemen, obwohl es sich um zwei in ihrer Funktion diametrale Vorgänge handelt.

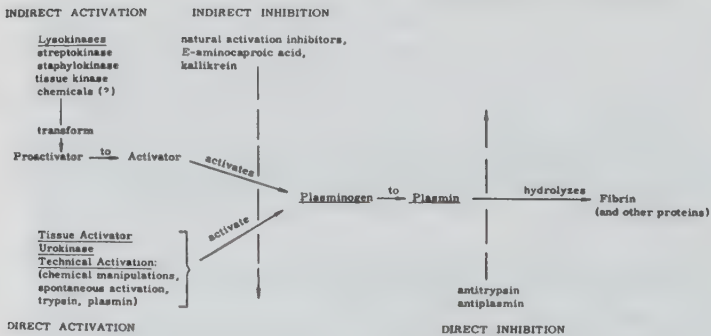


Fig. 1. Schematic outline of the most important phases of activation and inhibition of the fibrinolytic system.

Abb. 2: Schematische Aufzeichnung der wichtigsten Phasen der Aktivierung und Hemmung des Fibrinolyse-Systems.
(entnommen aus: von KAULLA 1963, 148)

Bei der Aktivierung der beiden Systeme entsteht jeweils ein proteolytisches Ferment: Thrombin und Plasmin. Beide sind in inaktiver Form als Prothrombin oder Plasminogen im Blut vorhanden. Ihre Aktivierung kann in beiden Fällen sowohl durch einen Gewebs-, der nach TODD (1959, 147) in den Gefäßwänden der Venen und Venolen vorkommt, als auch durch einen Blutaktivator, der ausschließlich durch Bestandteile des Blutes selbst gebildet wird (ALBRECHTSEN 1957, 2), zustandekommen.

Jedoch wäre die Fibrinolyse ohne Gegenregulation, ohne Inhibitoren nicht denkbar. Es zeigen sich auch hier wieder Ähnlichkeiten mit der Blutgerinnung.

Es lassen sich ähnlich den Antithrombinen hier zwei Typen von Antiplasminen unterscheiden (NORMAN et al. 1958, 105): ein progressiv wirkendes, das in der Elektrophorese mit der alpha-1-Globulinfraktion, und ein rasch wirkendes Antiplasmin, das mit der alpha-2-Globulinfraktion wandert.

Die Fibrinolyse (siehe Abb. 2) beginnt unter dem Einfluß eines Aktivators, der durch einen Antiaktivator gehemmt werden kann, mit der sehr langsamen enzymatischen Bildung von Plasmin aus Plasminogen (KLINE 1966, 72).

Das Equilibrium der Lyse-fördernden, sowie hemmenden Faktoren entscheidet, ob sich Fibrinolyse ereignet oder nicht. Plasmin - selten im freien Zustand im Blut vorhanden - hydrolysiert dann Fibrin zu Fibrindegradationsprodukten. Dieser Schritt kann durch die zwei vorhandenen Antiplasminen oder nach von KAULLA (1963, 148) durch Antitrypsin gehemmt werden.

5. Thrombolyse und Fibrinolyse

Es besteht noch keine Klarheit, mit welchem exakten Mechanismus sich die Fibrinolyse an der Thrombolyse beteiligt.

Zwei Theorien, über deren Zusammenwirken noch diskutiert wird, seien hier herausgegriffen.

Nach SHERRY et al. (1959, 130) soll Plasminogen während der Gerinnungsbildung im Thrombus gefangen werden. Da die in vivo-Thrombolyse mit einer hohen Konzentration von Plasminogen-Aktivator einhergeht, schlagen die Autoren vor, daß sich eine hohe Konzentration des Fibrinolyse-Aktivators in der Nähe des Thrombus bildet, der teils auf der Gerinnseloberfläche absorbiert wird, sowie in dieses eindringt. Innerhalb des Thrombus wird das Plasminogen dann zu Plasmin umgewandelt, wodurch sich nun die Thrombolyse ergibt.

Nach AMBRUS et al. (1960, 3) dagegen wandeln kleine Konzentrationen zirkulierenden Fibrinolyse-Aktivators Plasminogen in Plasmin um, das dann reversibel an Antiplasmin gebunden wird. Bei Kontakt mit dem Gerinnsel wird Plasmin aus dem Plasmin-Antiplasmin-Komplex freigesetzt und auf Fibrin, da dies eine höhere Affinität zu Plasmin besitzt, übertragen. Durch diese Übertragung des Plasmins auf das Gerinnsel wird die Thrombolyse in Gang gesetzt.

6. Synthetische Fibrinolytika

Auf der Suche nach leicht und billig herstellbaren, oral und prophylaktisch verabreichbaren Thrombolytika wurden die synthetischen Fibrinolytika entwickelt. (Von KAULLA 1969, 150)

Im Blut zirkulieren ein Plasminogenaktivator und Plasmin, normalerweise durch einen Anti-Aktivator, sowie Antiplasmin gebunden oder inaktiviert. Man benötigt daher große Konzentrationen von Aktivator, um diese Hemmung zu überwinden.

Auf Grund der Versuchsergebnisse entstand folgende Arbeitshypothese (von KAULLA 1969, 150), daß die Fibrinolytika als Anti-Inhibitoren durch Beseitigung, Binden oder Denaturierung von Antiplas-

min wirken. Sie werden wahrscheinlich auch einen Anti-Aktivator (AOKI, von KAULLA 1969, 4; 1970, 6) hemmen, wodurch sie den in vitro freigesetzten Blutaktivator ermöglichen, Plasminogen in ungehemmtes Plasmin umzuwandeln. Es zeigt sich, daß die inerten Proteine die synthetischen "in-vitro"-Fibrinolytika binden. Erst wenn diese Proteine abgesättigt sind, binden die Fibrinolytika den Anti-Aktivator und das Antiplasmin (an α -2-Makroglobulin gebunden) und inaktivieren diese beiden Inhibitoren.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Fibrinolytische Aktivität der synthetischen Verbindungen

Die fibrinolytische Aktivität wurde mit der von v. KAULLA (1965, 149) entwickelten "hanging-clot" und "plasma-clot"-Methode (von KAULLA, LEPPKE 1969, 151) gemessen.

Bei der "hanging-clot"-Methode hängt man ein standardisierten Gerinnsel aus rekalfiziertem menschlichen Zitratplasma in einer gepufferten NaCl-Lösung der zu testenden Verbindung auf, (siehe Abbildung 3, 1,0 - 3,0 mM) inkubiert bei 37°C und bestimmt dann die geringste Konzentration der Testverbindungen, bei der sich das Gerinnsel innerhalb 24 Stunden aufgelöst hat.

Diese Methode spiegelt das fibrinolytische Potential der synthetischen Verbindungen so genau wieder, daß es möglich war, auf Grund elektronischen, hydrophoben und sterischen Eigenschaften der Substanzen, eine multiple Regressionsanalyse zwischen der Beziehung von Struktur und fibrinolytischer Aktivität durchzuführen (HANSCH, von KAULLA 1970, 46).

Bei der "plasma-clot"-Methode (Plasmagerinnselmethode) werden verschiedene Konzentrationen der Testverbindung in menschlichem Zitratplasma gelöst und durch Kalziumchlorid oder Thrombin die Gerinnung dann induziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C wird die Fibrinolytika-Konzentration abgelesen, durch die das Gerinnsel innerhalb dieser Zeit aufgelöst wurde (siehe Abbildung 3, 10,0 - 14,0 mM).

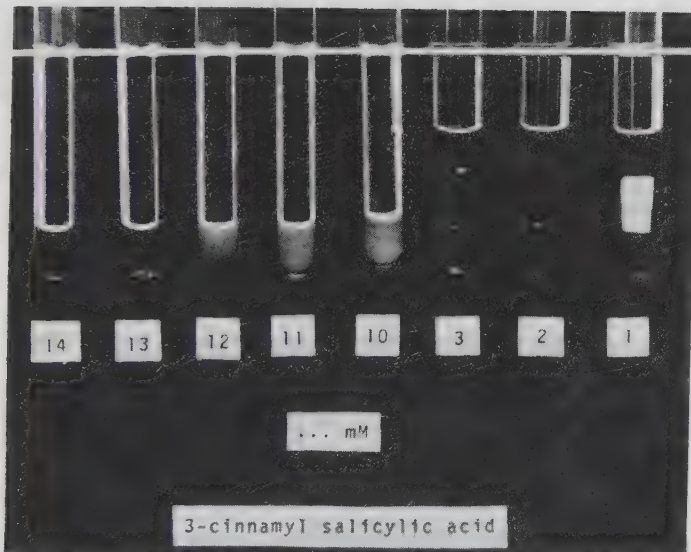


Abb. 3: Messung des fibrinolytischen Potentials der 3-Cinnamyl-salicylsäure (entnommen: von KAULLA, THILO 1970, 153)

Links im Bild Aktivitätsmessung mit der "Plasma-Clot"-methode. Sichtbar ist eine beginnende Auflösung bei 12,0 und eine vollständige Auflösung ab 13,0 mM zu beobachten.

Rechts im Bild zeigt die Messung mit der "hanging clot"-methode. Vollständige Auflösung des Gerinnsels bei 2,0 und 3,0 mM Endkonzentration.

2. Bezugsquellen für die synthetischen Fibrinolytika

1. Aldrich Chem. Co.; Milwaukee, Wisc. /USA
2. Eastman, Rochester, N.Y. /USA
3. Dr. C.H. Fuchsman, Ferro Corp., Bredford, Ohio/USA
4. K&K Laboratories, Plainview, N.Y. /USA
5. Matheson Scientific, Chicago, Ill. /USA
6. Dr. J. Meek, Department of Chemistry, Universität von Colorado, Boulder, Col. /USA
7. Dr. J. Spargue, Merk, Sharp&Dohme Research Laboratories, Elkhart, Ind. /USA
8. Miles Laboratories, Elkhart, Ind. /USA
9. Prof. Dr. H. Ruschig, Farbwerke Hoechst, Frankfurt-Hoechst, Deutschland
10. Dr. C.V. Winder, Parke Davis Research Laboratories, Ann Arbor, Mich. /USA

Die hier angegebenen Zahlen korrespondieren mit den Quellenangaben in Tabellen 7-10.

3. Thrombozytenaggregationsmessung

Die Thrombozytenaggregation wurde mit der photometrischen Registriermethode nach BORN (1962, 11) gemessen. Die Methode zeichnet kontinuierlich den Gang der Lichttransmission durch das Thrombozytenreiche-Plasma (TRP) auf, zu dem aggregationseinleitende, sowie hemmende oder beide Substanzen zugegeben wurden.

Im TRP wird das durchgesandte Licht durch die feine Thrombozytensuspension verteilt. Es ergibt sich dadurch keine Transmissionsveränderung auf Grund der homogenen Flüssigkeit. Durch Zugabe von Kollagen werden die Thrombozyten aggregiert. Je größer die Aggregate werden, desto weniger Licht wird in der Suspension absorbiert, d.h. mehr Licht trifft auf die der Lichtquelle gegenüberliegenden Photozelle.

Die verschiedenen Lichtintensitäten werden in elektrische Impulse

umgewandelt, diese in ein Aufzeichnungsgerät eingegeben und die dafür typischen Aggregationskurven aufgezeichnet.

Kollagen wurde wegen seiner Rolle in der Thrombogenese (SPAET, ERICHSON 1966, 141) als aggregationseinleitendes Agens verwandt. Gefriergetrocknetes, lyophilisiertes Kollagen (aufbewahrt bei -20°C) aus Rindercorium stellte freundlicherweise Dr. W.R. Thomas (Armour Pharmaceuticals, Kankakee, Ill./USA) zur Verfügung.

Für alle Versuche wurde frisches Thrombozyten-reiches, menschliches Zitratplasma verwandt.

4. Apparatur

Die Apparatur (siehe Abbildung 4) besteht aus einem "Evans Titra-tor head" (Evans Electroselenium, ST. Andrews Works, Halstead, Essex, England), der durch einen im Lichtstrahlengang befindlichen, thermostatisch kontrollierten ($37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) Küvettenhalter verbessert wurde (Medical Engineering Department der Universität von Colorado, Medical Center, Denver/USA).

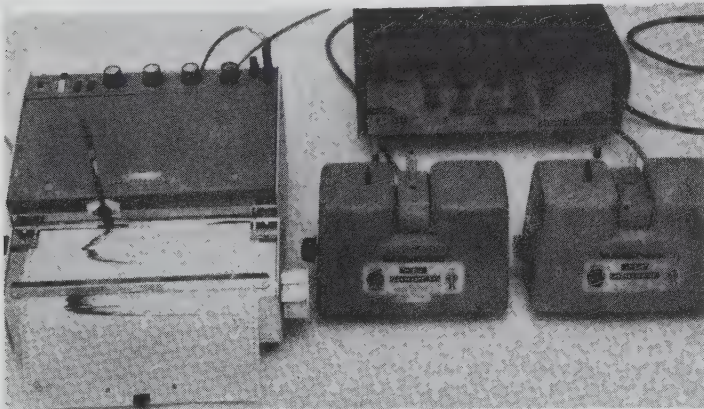


Abb. 4: Apparatur für die Aggregationsmessungen.
Links der Heath-Rekorder, rechts vorne die beiden Evans-Titratoren und hinten die Kontrollschaltstelle.

Die von der Photozelle aufgefangene Lichtintensität wird durch einen potentiometrischen Wechsler und einen Zerosuppressionskreis in einen Rekorder, versehen mit einem hohen Widerstand, (Heath Servo Rekorder, Modell EU -20B) eingegeben.

Zwischen Lichtquelle und Küvette befindet sich noch ein dunkelroter Glasfilter (Modell Evans Nr. 609), der erst bei einer Lichtwellenlänge von 656 m μ für das Licht durchlässig ist.

Die Aggregationskurven werden auf dem Registrierpapier (Laufgeschwindigkeit 2,54 cm/Minute) graphisch aufgezeichnet.

Das Thrombozyten-reiche-Plasma wird durch ein Teflon bezogenes Magnet (7x3x4 mm; Berge Inc., South Plainfield, N. J. /USA) in der silikonisierten Küvette automatisch gerührt.

Weiterhin wurden noch ein Glasgrünfilter (Modell Evans Nr. 604) und zwei Kodak Wratten Gelatine Filter Nr. 70 (dunkelrot) und Nr. 47 B (blau) verwandt.

5. Vorbereitung der Versuche

a. Silikonisierung

Alles Glasmaterial, mit Ausnahme der Einmalmikropipetten, wurde frisch mit vaporisierter Silikonlösung (General Electric Dry Film Nr. SC 11994) nach der Methode von JAUQUES (1955, 66) silikonisiert. Ist eine Küvette nicht mehr gut silikonisiert, kann dieses leicht in der zwei Minuten langen Equilibrationsperiode, die der Kollagenzugabe vorausgeht, festgestellt werden. Es ergibt sich in diesem Falle dann eine Transmissionsveränderung, die im Anstieg der Aggregationskurve sichtbar wird und damit eine beginnende Spontanaggregation anzeigt. Als Beweis dafür dienen die lichtmikroskopischen Ergebnisse, durch die die Spontanaggregation objektiviert wurde.

b. Blutentnahme

Es wurden nur menschliche Thrombozyten in allen Experimenten verwandt, da SINAKOS und CAEN (1967, 132) nachgewiesen haben, daß Tierthrombozyten in Aggregationsexperimenten anders als menschliche auf ADP, menschliches Kollagen und Rinderthrombin reagieren.

Das Blut wurde mit einer Einmal-20-gauge-hyodermen Nadel mit der Zweispritzentechnik von sechs männlichen (22 - 53 Jahre alt) und einer weiblichen (23 Jahre alt, keine Antikonzeptivaeinnahme) Testperson durch Punktion der vena cubitalis entnommen. Alle voluntären Spender waren klinisch gesund und nahmen keine Medikamente sieben Tage vor Blutentnahme ein.

Verworfen wurde der Inhalt der ersten Spritze (5 ml), um dann das Blut in die folgenden Glasspritzen, gefüllt mit 3,8 % Trinatriumzitrat im Verhältnis 1:9, langsam, um Luftblasen zu vermeiden, aufzuziehen.

Durch leichtes, vorsichtiges Schwenken mischte sich die Zitratflüssigkeit mit dem Blut, das anschließend sofort in Zentrifugationsgläser verteilt und bei einer Temperatur von + 4°C 15 Minuten lang mit 235 x g in einer "International Clinical Centrifuge" (Modell CL) zentrifugiert wurde.

Das Thrombozyten-reiche-Plasma hob man mit Pasteur-Pipetten von den sedimentierten Erythrozyten ab und vereinigte es bei + 4°C in einem silikonisierten Reagenzglas. Sofort nach der hierdurch erzielten Homogenisierung der Thrombozytensuspension wurde eine Serie von Küvetten mit Aliquoten (0,9 ml) von TRP gefüllt und bis zum Beginn des Einzelexperimentes bei + 4°C aufgehoben. Alle Aggregationsversuche mit einem individuellen Plasma waren innerhalb von vier Stunden beendet.

c. Herstellung der Natriumsalze der Fibrinolytika

Alle getesteten chemischen Verbindungen fanden nur in der Form ihrer Natriumsalze in den Experimenten Anwendung. Ein Teil der Verbindungen waren bereits als Natriumsalze zur Verfügung gestellt worden.

Die noch nicht in Salzform vorliegenden Verbindungen wurden in absolutem Äthylalkohol aufgelöst und mit 1% Natriumlauge bis zum pH-Wert von $7,4 \pm 0,1$ neutralisiert.

Zur pH-Messung diente ein Corning Research pH-Messer (Modell 12, Corning Scientific Instruments, Medfield, Mass/USA).

Die Verbindungen kristallisierten bei einer Temperatur von $\pm 40^{\circ}\text{C}$ in einem Vakuumofen aus und wurden dann als fein verriebenes Pulver in einer Konzentration von 20,0 mM in Veronal-Azetat-Puffer (= gepufferte NaCl-Lösung, pH-Wert 7,42) aufgelöst. Nur in Spezialfällen waren höhere Konzentrationen notwendig. Die Verbindungskochsalzlösungen werden mit verbindungsfreier, gepuffelter NaCl-Lösung solchermaßen vermischt, daß 0,08 ml dieser Mischung, zum Aggregationsansatz zugesetzt, die gewünschte Plasmaendkonzentration der zu testenden Verbindung ergab.

Die luftdicht verschlossenen Verbindungslösungen wurden nie länger als 1 Woche bei Zimmertemperatur aufgehoben.

d. Kollagensuspensionsherstellung

Die Kollagensuspension wurde von etwa 1,5 mg Kollagen hergestellt, die mit ca. 1,5 ml kalter ($+4^{\circ}\text{C}$) physiologischer NaCl-Lösung so lange in einem Glashomogenisierer (Nr. 18790, A.H. Thomas, Philadelphia, Mass, USA) mit einem teflonbezogenen Stempel manuell homogenisiert, bis die Lichttransmission der Suspension in einer Coleman, Küvette (Nr. 6-310 C, 10 x 75 mm) 40 % gegen destilliertes Wasser bei einer Wellenlänge von 420 m μ betrug.

Dieses erforderte eine gelegentliche Verdünnung mit 0,85 % NaCl-Lösung.

Die Suspension, in einem Eisband aufgehoben, wurde nach 8 Stunden nicht mehr benutzt.

Es wurde mit besonderer Sorgfalt darauf geachtet, keine großen Kollagenteilchen in das Experiment-Plasma zu pipettieren.

Es scheint äußerst wichtig zu sein, daß das gefriergetrocknete Kollagen bei einer tiefen Temperatur (ca. -20°C) aufgehoben wird, da sich in Versuchen zeigte, daß eine Aufbewahrung in trockenem Zustand bei -4°C ein Verlust der Oszillation in der Aggregationskurve resultiert, der auf einer möglichen Veränderung des Kollagens (seiner Struktur oder elektrischen Ladung?) beruhen könnte.

6. Chemikalien

Trinatriumzitat U.S.P. 3,8 %

NaCl Baker Analysed reagents 0,85 %

Michaeli Veronal-Azetat-Puffer pH 7,42 (MICHAELIS 1931, 88)
gepufferte NaCl-Lösung:

4 Teile NaCl-Lösung 0,85 %

1 Teil Veronal-Azetat-Puffer pH 7,42

7. Messung der Aggregationshemmung durch die Fibrinolytika

a. Einstellung der Maschine

Die Standardisierung des Titrators, sowie des Rekorders wurde am Anfang aller Experimente durchgeführt und bis zum Ende aller Versuche nicht verändert, um eine Vergleichsmöglichkeit zwischen den einzelnen Aggregationskurven herzustellen.

Weiterhin wurde eine 10 mV Sensitivität für den Rekorder gewählt. Der Beginn der Aggregationskurven des individuellen Plasmas wur-

de durch den Null-Knopf des Rekorders auf dem Registrierpapier so eingestellt, daß die Kontrollaggregationskurve ca. 4/5 der Papierbreite einnahm.

b. Versuchsansatz

0,9 ml Thrombozyten-reiches-Plasma (TRP) und 0,08 ml gepufferte NaCl-Lösung mit der zu testenden Verbindung oder gepufferte NaCl-Lösung allein (für die Kontrollen) wurden in der Küvette mit einem Teflon-bezogenen Magnet für genau 5 Minuten bei 37°C in einem Wärmeblock (Servoblock Modell 13, Precision Scientific Comp. Chicago, Ill./USA) vorinkubiert, anschließend in den Titrator überführt und dem, nun magnetisch gerührten TRP erlaubt, für genau 2 Minuten zu equilibrieren, bevor mit einer Mikroeinmalpipette 20 µg/ml Kollagensuspension zugegeben wurden. Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten, um nicht kontrollierbare Einflüsse wie z.B. Spontanaggregation auszuschließen.

Jedes Gesamtexperiment bestand aus einer raschen Folge von Einzelexperimenten: einmal mit TRP und Kollagen als wiederholte Kontrollen, zum anderen aus Einzelexperimenten mit Aliquoten desselben Plasmas, die jedoch mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Verbindung vorinkubiert worden waren.

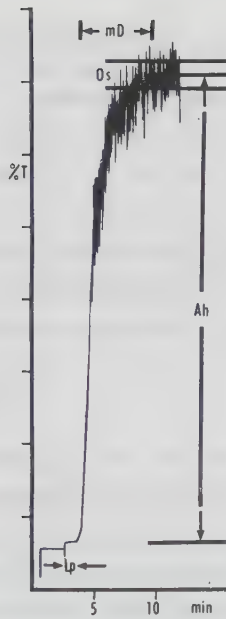


Abb. 5: Kontrollaggregationskurve mit berechneten Aggregationsparameter.

Lp = Latenzperiode

Os = Oszillation

mD = maximale Deflektion

Ah = Aggregationshöhe

%T = steigende Licht-Transmission in Prozent ausgedrückt

min = Dauer des Experimentes

8. Berechnung der Aggregationskurven

Die Thrombozytenaggregationskurve besteht aus vier Parameter (siehe Abbildung 5)

- (1) Latenzperiode (Lp)
- (2) Maximale Deflektion (mD)
- (3) Aggregationshöhe (Ah)
- (4) Oszillation (Os)

Latenzperiode

Die Latenzperiode, gemessen in Sekunden, ist definiert als die Zeitspanne nach der Zugabe der Kollagensuspension bis zur ersten großen, registrierten Lichttransmissionsveränderung in der Aggregationskurve.

Maximale Deflektion

Die maximale Deflektion, gemessen in Sekunden, ist der zeitliche Ausdruck, mit welcher Geschwindigkeit die Aggregation ihre maximale Höhe erreicht und wird von der ersten großen, registrierten Lichttransmissionsveränderung bis zum Scheitel der Aggregationskurve gemessen.

Aggregationshöhe

Die Aggregationshöhe ist der Abstand in Zentimetern von der unmittelbar nach Kollagenzugabe erhaltenen Grundlinie, bis zu der in der Mitte der Oszillation liegenden Scheitelhöhe der Aggregationskurve.

Oszillation

Die Oszillation, gemessen in Millimetern, drückt die Breite der Aggregationskurve an ihrem Scheitel aus.

Nach O' BRIEN und HEYWOOD (1966, 110) soll sie wahrscheinlich die Form der Thrombozyten anzeigen. Weiterhin werden dafür noch die Anzahl und Größe der Thrombozytenaggregate diskutiert.

Berechnung der Aggregationshemmung

Die Durchschnittsaggregationshöhe aller Kontrollen eines Gesamtexperimentes tritt als 100 % Aggregation oder als 0 % Aggregationshemmung in die Berechnung ein. Die Aggregationshöhe eines Fibrinolytikum-Experimentes wird als Prozentwert der Durchschnittsaggregationskontrollhöhe dieses Gesamtexperimentes ausgedrückt. Die Differenz zu 100 % wird dann als Aggregationshemmung bezeichnet.

9. Thrombozytenzählung

Die Zählung wurde mit einem Labolux-Leitz-Phasenkontrastmikroskop nach der Methode von BECHER und CRONKITE (1950, 17) durchgeführt.

Das Thrombozyten-reiche-Plasma wurde für diese Zählung aus dem Reagenzglas entnommen, das zur Homogenisierung der Thrombozytensuspension diente.

10. pH-Wertmessung der Thrombozytensuspension vor und nach der Aggregation

Die pH-Wertmessung wurde sofort vor und nach der Kollagen-induzierten Aggregation mit dem bereits erwähnten Corning pH-Messer durchgeführt.

11. Statistik

Es wurden folgende Formeln und Veröffentlichungen für die statistische Berechnung angewandt: CLAUSS, EBNER 1967, 22; SOKAL, ROHLF 1969, 135; HARTLEY 1940, 49.

(1) Durchschnitt μ

$$\mu = \frac{\sum X_i}{n}$$

X_i = einzelne Beobachtungen

n = Anzahl der Beobachtungen

(2) Standard Abweichung s

$$s = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n - 1}}$$

(3) Varianz s^2

$$s^2 = (\text{Standard Abweichung})^2$$

(4) Korrelationskoeffizient r

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{(\sum X_i^2)(\sum Y_i^2)}}$$

$$\sum x_i y_i = \sum X_i Y_i - \frac{(\sum X_i)(\sum Y_i)}{n}$$

X_i = Beobachtungen aus Parametergruppe 1

Y_i = Beobachtungen aus Parametergruppe 2

n = Anzahl der Gesamtbeobachtungen

(5) Test für die Homogenität der Varianz in normal verteilten Beobachtungen M

$$M = N \log_e \left[N^{-1} \sum_{t=1}^k \nu_t s_t^2 \right] - \sum_{t=1}^k \nu_t \log_e s_t^2$$

k = Gesamtzahl der Beobachtungen

N = Summe von $(n-1)$ Beobachtungen

ν_t = $(n-1)$

s_t^2 = Varianzwerte

12. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Untersuchungen, durchgeführt mit einem Leitz-Phasenkontrastmikroskop, schlossen sich sofort an das Ende der Aggregationseinzelerperimente an. Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden eine Leitzkamera (Modell DBP) und ein Kodak Tri-X oder Plux X Panchromatic Film Typ B, für die makroskopischen Aufnahmen wurden eine Nikon-Ftn-Photonic-Kamera und ein Kodak Plus X Panchromatic Film Typ B verwandt.

13. Vorbereitungen und Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop

Diese Experimente wurden in zwei Teile unterteilt, um den Einfluß der chemischen Verbindungen auf die Ultrastruktur der Thrombozyten

(1) nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten

(2) nach Inkubation mit folgender Aggregation durch Kollagen zu untersuchen.

Testansatz für (1)

0,9 ml TRP und 0,1 ml gepufferte NaCl-Lösung für die Kontrolle, und 0,9 ml TRP, 0,05 ml gepufferte NaCl-Lösung und 0,05 ml Fibrinolytikum (Endkonzentration 1,0 mM) für die Versuchsexperimente wurden in einem Wasserbad bei 37°C für 5 Minuten inkubiert und anschließend fixiert (siehe unten). Von der Blutentnahme bis zur Fixierung vergingen bei diesem Testansatz 35 Minuten.

Testansatz für (2)

0,9 ml TRP, 0,03 ml gepufferte NaCl-Lösung und 0,05 ml Fibrinolytikum (für die Kontrolle: 0,9 ml TRP + 0,08 ml gepufferte NaCl-Lösung) wurde genau 5 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C vorin-

kubiert, dann mit 0,02 ml Kollagensuspension die Aggregation induziert und für genau 5 Minuten vorsichtig mit der Hand geschüttelt. Von der Blutentnahme bis zur Fixierung vergingen bei diesem Testansatz 45 Minuten.

Fixierung

Die Fixierung wurde mit 1 % Glutaraldehyd und 1 % OsO_4 -Lösung (Plasmaendkonzentration für beide 1 %) vorgenommen, entwässert in aufsteigender Alkoholreihe, vorbereitet für die Einbettung in Vestpal W (Martin Aeger, Specialites pour Laboratoires, Vesenaz, Genf, Schweiz) durch aufsteigende Azetonreihe.

Für die ultradünnen Schnitte diente ein Porter Blum Ultramikrotom (Modell MT 1, Sorvall & Corp.). Die Schnitte wurden dann mit 2 % Uranylacetat nach WATSON (1958, 154) und mit Bleizitrat nach REYNOLDS (1963, 121) behandelt und auf Kupferobjektträgern in einem RCA-EMU-3G-Elektronenmikroskop untersucht. Kodak "electron image plates" dienten als photographische Platten.

Die Abbildungen EM 1 - 5 stellen eine Auswahl aus 675 elektronenmikroskopischen Aufnahmen dar.

C. ERGEBNISSE

In den vorliegenden Untersuchungen wurden 370 Einzelexperimente mit 38 synthetischen Fibrinolytika und 163 Kontrolleinzelexperimente an 49 Thrombozyten-reichen-Plasmen von sieben Spendern durchgeführt.

1. Literaturnachforschungen

Wie sich durch Literaturnachforschungen (siehe Anhang Tabelle 11) ergeben hat, besteht eine sehr große Variationsbreite in der Herstellung und Aufbewahrung von Thrombozyten-reichem-Plasma (TRP).

Das Blut von Tieren (z.B. Schwein, Hase) und Menschen wird in verschiedenen Antikoagulantien (z.B. Zitrat, EDTA, Heparin), sowie in verschiedenen Konzentrationen aufgefangen.

Für die Zentrifugationskraft wird "langsam", "Differentialzentrifugation" und ein Bereich von $77 - 250 \times g$ als Werte angegeben.

Die Zentrifugationsdauer liegt zwischen 8 - 15 Minuten bei Zimmertemperatur oder $+ 4^{\circ}$ für die Herstellung TRP.

Die Aufbewahrung der Thrombozytensuspension schwankt zwischen Zimmertemperatur und $+ 4^{\circ}C$.

Es lassen sich daher keine eindeutigen, allgemein akzeptierten Antworten auf diese Fragen, sowie Arbeitsrichtlinien finden.

2. Kontrollexperimente

a. Einfluß der Thrombozytenzahl auf die Aggregationshöhe

Bei 19 von 49 TRP wurde die Thrombozytenzahl pro Kubikmillimeter bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden mit den Kontrollaggregationshöhen korreliert.

Als Durchschnittswerte für die Thrombozyten/cmm Plasma ergab

sich 547 100/cmm mit einer Standard-Abweichung von 102 640/cmm. Die Streubreite betrug 395 000 - 815 000/cmm.

Mit diesen Plasmen wurden 69 Kontrolleinzelexperimente durchgeführt. Die Durchschnittsaggregationshöhe betrug 18,1 cm mit einer Standard-Abweichung von 3 cm. Für die Streubreite ergaben sich Werte im Bereich zwischen 12,4 - 23,2 cm.

Der Korrelationskoeffizient r zwischen der Aggregationshöhe und der Thrombozytenzahl/cmm wurde für diese 69 Experimente mit 0,021 errechnet (siehe Abbildung 5). Damit zeigte sich, daß in diesen Untersuchungen keine Relation zwischen diesen beiden Parametern bestand. Aus diesem Grund war es nicht notwendig, eine Standardisierung der Thrombozytenzahl/cmm durchzuführen.

b. pH-Messungen

Der pH-Wert der Thrombozytensuspension wurde vor und sofort nach dem Ende des Aggregationsexperimentes durchgeführt.

Für die Kontrollen und die mit Fibrinolytika vorbehandelten Plasmen konnten folgende Durchschnittswerte gemessen werden (siehe Tabelle 1).

Wie aus dieser Zusammenstellung zu ersehen ist, wird der pH-Wert der Thrombozytensuspension durch die Fibrinolytika nicht wesentlich verändert.

TABELLE 1

	<u>TRP⁺ allein</u>	<u>Kontrollen + Kollagen</u>	<u>TRP⁺+Fibrinolytikum + Kollagen</u>
Durchschnitt	7,554	7,698	7,735
Stand.Abw.	0,242	0,065	0,066
n	9	24	63

pH-Durchschnittswerte für TRP⁺ (Thrombozyten-reiches-Plasma), Kollagenkontrollen, sowie mit Fibrinolytika vorbehandeltes TRP mit Kollagen.

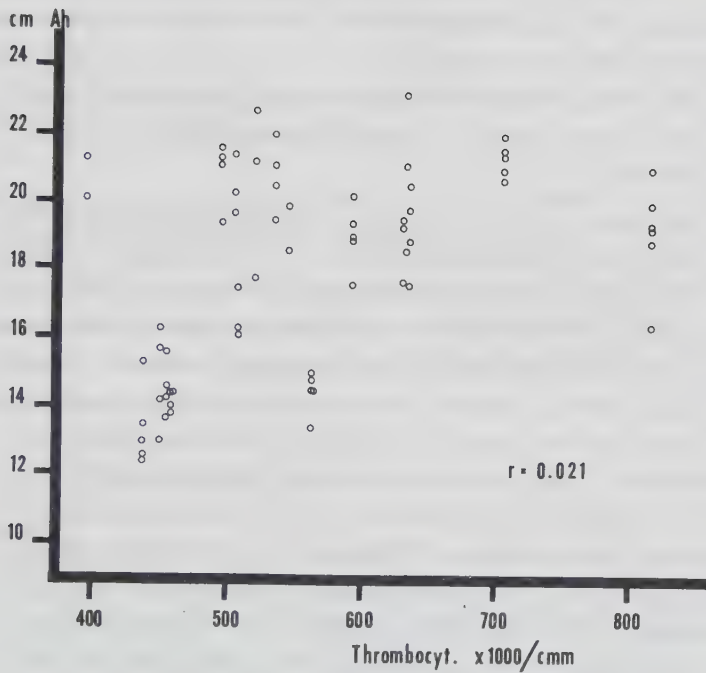


Abb. 5: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl / cmm Plasma (Abszisse) und der Kontrollaggregationshöhe (Ah, Ordinate). Gesamtzahl der Experimente $n = 69$

c. Statistische Berechnungen der Kontrollwerte

Tabelle 4 - 6 stellen die einzelnen Kontrollwerte für die gemessenen Parameter der Aggregationskurve dar: Latenzperiode, maximale Deflektion und Aggregationshöhe.

Abbildung 6 zeigt diese Parameterdurchschnittswerte für die einzelnen Testpersonen; Abbildung 7 eine Häufigkeitsverteilung der genannten Meßwerte.

Wie aus den Berechnungen hervorgeht, variieren die Durchschnitte der Parameter aus unbekannten Gründen von Experiment zu Experiment sehr stark, obwohl sie innerhalb eines Versuches relativ konstant bleiben. Da nicht bewiesen werden konnte, daß die Kontrollwerte einer idealen Gauss'schen Normalverteilung gehorchen, war es auch nicht möglich, diese zu signifikanten Werten zusammenzufassen. Daher konnten einfache statistische Berechnungen nicht angewandt werden, zumal eine Analyse einzelner Experimente auf Grund ihrer niedrigen Anzahl von Kontrollversuchen und damit geringen Zahl von Freiheitsgraden (2-6) keine große Aussagekraft beigemessen werden kann. In der Hoffnung, doch noch eine statistische Berechnung durchführen zu können, wurden die Kontrollvarianzwerte berechnet. Doch auch hier zeigte sich, daß eine zu große Variation von Experiment zu Experiment vorhanden war.

Dennoch wurden die Durchschnitte der drei Parameter errechnet, um einen ungefähren Überblick sowie Anhaltspunkt für die Länge der Latenzperiode, maximale Deflektion und Aggregationshöhe zu erhalten.

Für die gesamten Kontrolleinzelexperimente ($n = 163$) ergaben sich die in Tabelle 2 zusammengefaßten Werte.

TABELLE 2

	<u>Latenzperiode</u>	<u>Max. Deflekt.</u>	<u>Aggreg. Höhe</u>
Durchschnitt	56,5 sec	341,5 sec	18,2 cm
Stand. Abw.	23,1 sec	105,7 sec	2,8 cm

Durchschnittswerte der gemessenen Parameter aller Kontrollexperimente (n = 163)

Die Länge der Latenzperiode und der maximalen Deflektion liegen in dem in der Literatur dafür angegebenen Zeitbereich.

Trotz der oben genannten Schwierigkeiten werden hier alle berechneten Durchschnittswerte berichtet, um die Schwankungen in den Werten der einzelnen Testpersonen, und zwischen den Testpersonen aufzuzeigen.

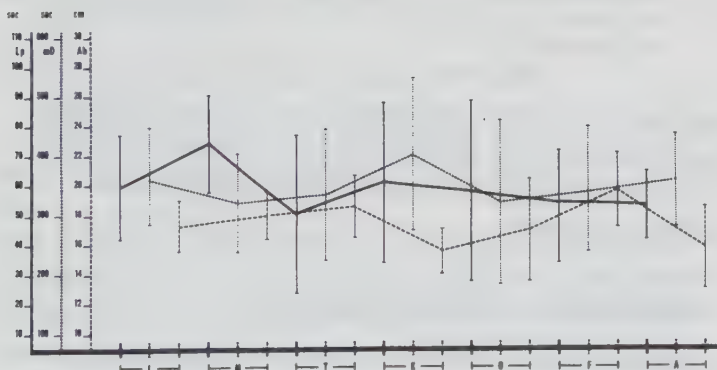


Abb. 6: Kontrolldurchschnittswerte mit einfacher Standardabweichung der einzelnen Testpersonen von folgenden Parametern: Latenzperiode (Lp, —), maximale Deflektion (mD,), Aggregationshöhe (Ah, — — —); Testpersonen aufgetragen an der Abszisse

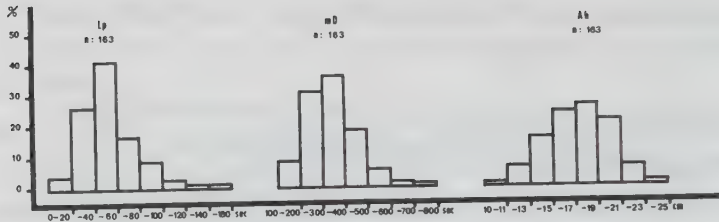


Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der Parameter von 163 Kontrollexperimenten; Lp: Latenzperiode; mD: maximale Deflektion; Ah: Aggregationshöhe

Aufmerksam sei auf die Schwierigkeit der Berechnung der Aggregationshemmung, sowie des bedenkenlosen Zusammenfassens dieser Werte bei der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten gemacht.

3. Inkubationszeit des TRP mit Fibrinolytika

Die Aggregationshemmung der Fibrinolytika wird durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 30 Minuten bei 37°C nicht besonders verstärkt oder verändert. Da bei weiterer Ausdehnung der Inkubationszeit bereits nicht kontrollierbare Veränderung im Plasma (wie z.B. Schlierenbildung, die eine beginnende Aggregation anzeigt) vor sich geht, wurde die Inkubationszeit auf fünf Minuten beschränkt.

Dadurch wird das Sichtbarwerden des durch die Fibrinolytika ausgelösten Hemmeffekt der Kollagen-induzierten Aggregation sicher nicht beeinflußt.

4. Vorinkubierung der Kollagensuspension mit Fibrinolytika

Wird die Kollagensuspension auch mit niedrigen Konzentrationen Fibrinolytika für fünf Minuten bei 37°C vorinkubiert, verliert diese Suspension ihre aggregationsleitende Kraft. Inkubiert man das Kollagen allein bei 37°C für fünf Minuten, bleibt die aggregations-induzierende Wirkung erhalten.

Die Fibrinolytika hemmen diese Aggregationswirkung des Kollagens in einem konzentrationsabhängigen Verhältnis, obwohl in den höheren Konzentrationen eine Zerstörung des Kollagens zu diskutieren ist.

Tabelle 3 möge diese Abhängigkeit für ein Phenylderivat der 4-Aminothiophen-3-carbonsäure verdeutlichen.

5. Lichttransmission und Thrombozytenaggregate

Die Beziehung von Lichttransmission zur Größe der Thrombozytenaggregate läßt sich sehr deutlich aus den Abbildungen 8 und 9 erkennen.

Jede Abbildung ist zusammengesetzt aus photomakroskopischen Aufnahmen von einem Plasma unter verschiedenen experimentellen Bedingungen mit der von diesem Einzelexperiment erhaltenen Lichttransmissionskurve. Jede Aufnahme wurde sofort nach dem Aggregationsversuch vorgenommen.

Abb. 8/1 zeigt reines TRP mit einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C. Es läßt sich eine Aggregatbildung nicht feststellen, folglich kann auch keine Lichttransmissionsveränderung in der Aggregationskurve registriert werden.

TABELLE 3

Verlust der aggregationsinduzierenden Wirkung der Kollagensuspension im TRP, hervorgerufen durch Vorinkubierung (5 Minuten, 37°C) mit N(2, 4, 6-trimethylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure im Vergleich zur Aggregationshemmung dieses Fibrinolytikums durch Vorinkubierung (5 Minuten, 37°C) mit TRP und anschließender Aggregation durch nicht vorbehandeltes Kollagen.

Fibrinolytikum Endkonzentration im Plasma in mM	(1)Fibrinolytikum +TRP in % der Kon- trollaggregation	Fibrinolytikumkonzentra- tion in Kollagensuspension in mM	(2)Kollagensuspension +Fibrinolytikum in % der Kontrollaggregation
0,1	93,5 %	0,1 (0,002 ⁺)	91,4 %
0,4	92,5 %	0,4 (0,008 ⁺)	10,2 %
1,0	59,1 %	1,0 (0,02 ⁺)	15,1 %
5,0	69,9 %	5,0 (0,1 ⁺)	0,0 %
10,0	8,1 %	10,0 (0,2 ⁺)	0,0 %

Erklärung:

ad (1): 0,9 ml TRP + 0,8 ml (Fibrinolytikum + gepufferte NaCl-Lösung), Inkubation: 5 Minuten, 37°C, Aggregation durch 0,02 ml nicht vorbehandeltes Kollagen, mM: Fibrinolytikumendkonzentration im TRP in Millimol.

ad (2): Kollagensuspension mit steigenden Fibrinolytikumendkonzentrationen in Millimol.

Inkubation: 5 Minuten, 37°C, dann Zugabe von 0,02 ml Kollagen-Fibrinolytikum-Lösung zu 0,98 ml (TRP+gepufferte NaCl-Lösung), es folgt die Aggregation.

(⁺): Fibrinolytikumplasmaendkonzentrationen, die sich nach der Zugabe zum TRP ergeben.

Gibt man nun Kollagen mit einer Mikroglaspipette zum Kontrollexperiment dazu (siehe Pfeil in der Aggregationskurve) können bereits nach ca. 30 Sekunden sichtbare Thrombozytenaggregate mit dem unbewaffneten Auge festgestellt werden, Voraussetzung für die Aggregatbildung ist aber, daß das TRP durch Magnet gerührt wird, da sich sonst keine oder zumindest eine zeitlich stark verzögerte Aggregation einstellt. Diese Verzögerung drückt sich dann noch in einer Latenzperiodenverlängerung aus.

Durch die Kollagen-induzierte Aggregation verändert sich das Erscheinungsbild des TRP. Am Ende eines Kontrollexperimentes erscheint die Plasmaflüssigkeit klar, da sich alle Thrombozyten zu Aggregaten zusammengelagert haben und diese nach wenigen Sekunden Ruhe auf den Boden des Reagenzglases absinken.

Die mit Fibrinolytika vorbehandelten Plasmen dagegen zeigen mit steigender Plasmaendkonzentration der Substanzen eine Verkleinerung der Aggregatgrößen, die sich dem unbewaffneten Auge als milchige, feine Aggregatsuspension darstellt.

Weiterhin resultiert diese Verringerung der Aggregatgröße in dem Verlust der Oszillation der Lichttransmissionskurve, wie das zum großen Teil bei diesen vorbehandelten TRP festzustellen war.

Es läßt sich aus den Abbildungen 8 und 9 noch erkennen, daß die Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation von der Plasmaendkonzentration der Fibrinolytika abhängt, obwohl diese Abhängigkeit durch statistische Berechnungen schwierig zu beweisen war.

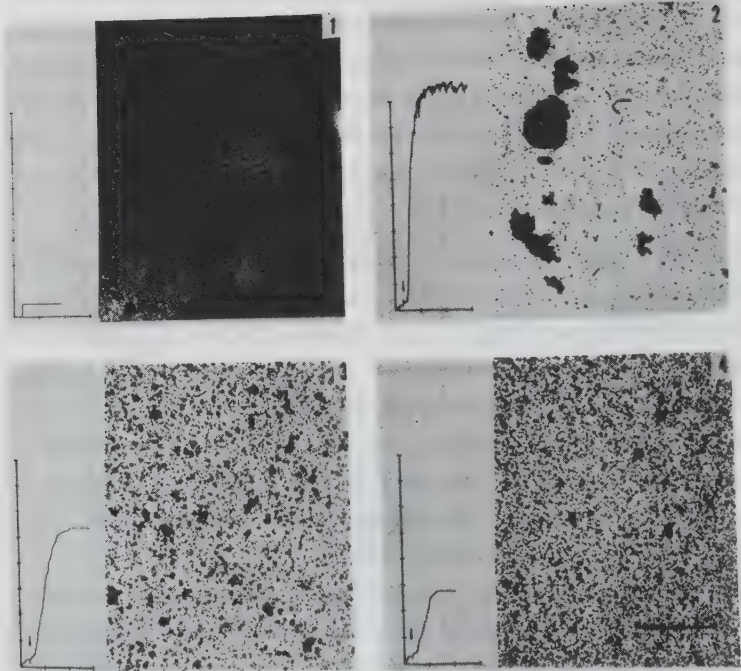


Abb. 8: Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in vitro in frischem Zitratplasma durch N(2, 4, 6-trichlormethylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure. Vergleich der aus dem jeweiligen Einzelexperiment erhaltenen Lichttransmissionsgang zur Aggregatgröße. Pfeil: Kollagenzugabe. Ein Teilstrich: 1 mm. Makrophotographien des TRP zur Zeit maximaler Aggregation. Original: 5 x Vergrößerung

Feld 1: TRP ohne Vorbehandlung
 Feld 2: Kollagenkontrolle (0% Hemmung)
 Feld 3: Endkonzentration im Plasma 0,5 mM (34,7%)
 Feld 4: Endkonzentration im Plasma 1,0 mM (70,5%)

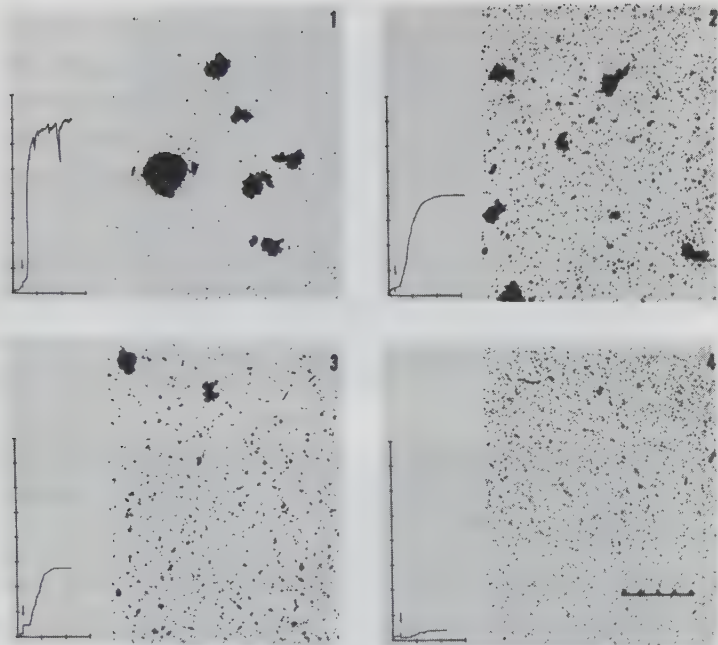


Abb. 9: Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in vitro in frischem Zitratplasma durch Fibrinolytika. Vergleich der aus dem jeweiligen Einzelexperiment erhaltenen Lichttransmissionsgang zur Aggregatgröße. Pfeil: Kollagenzugabe. Ein Teilstrich: 1 mm. Makrophotographien des TRP zur Zeit maximaler Aggregation. Original: 5 x Vergrößerung

Feld 1: Kollagenkontrolle 0% Hemmung

Feld 2: 5-jod-salicylsäure Endkonz. i. Plasma 0,5 mM
36,5 % Hemmung

Feld 3: N(3-trifluormethylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure Endkonz. i. Plasma 0,5 mM
61,5 % Hemmung

Feld 4: N(2-chlor-3-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure, Endkonz. 0,5 mM, 95,9 % Hemmung

6. Neue Methode zur Differenzierung zwischen Aggregaten entstanden bei Kontroll- und Fibrinolytikaexperimenten

Durch Veränderung der Achse des Lichtstrahlenganges im Phasenkontrastmikroskop lassen sich die Thrombozytenaggregate als halbräumliche Gebilde darstellen. Die in Abbildung 10 enthaltenen zwei Mikrophotographien sollen diese neue Methode anschaulich verdeutlichen.

Für dieses Experiment wurde TRP mit einer Plasmaendkonzentration von 1,0 mM der N(2-chlor-6-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure vorinkubiert und anschließend mit Kollagen aggregiert. Es ergab sich eine 100 %-ige Aggregationshemmung durch diese Substanz.

Die obere Mikrophotographie zeigt das TRP nach maximaler Aggregation, aufgenommen mit normalem Lichtstrahlengang im Phasenkontrastmikroskop.

Wird die Achse des Lichtstrahlenganges nun verändert, stellt sich die gleiche Aufnahme als halbräumliches Bild der Thrombozyten und ihrer Aggregate dar.

Mit dieser Aufnahmetechnik läßt sich deutlich zwischen Kontroll- und mit Fibrinolytika vorbehandelten Aggregaten unterscheiden. Mit Fibrinolytika erscheinen flache, wenige Thrombozytenschichten dicke, kugelförmige, zuckerhutförmige Aggregate im Gegensatz zu den verschwommenen, vielschichtigen, dicken, unregelmäßig gewellten und oft bis zu 3 mm langen und 1 mm dicken Kontrollaggregaten.

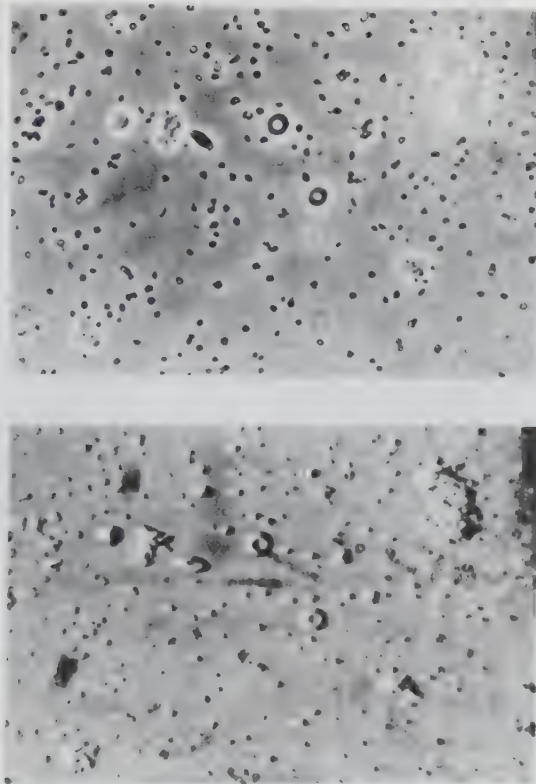


Abb. 10: Mikrophographien Thrombozyten-reichen-Plasmas zur Zeit maximaler Aggregation (durch Kollagen induziert). Aggregationshemmung (100 %) durch N(2-chlor-6-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure, Endkonzentration im Plasma 1,0 mM, Originalvergrößerung 133 x. Untere Aufnahme entstand durch Veränderung der Lichtstrahlachse des Mikroskopes. Sichtbar sind Erythrozyten sowie Thrombozyten, die hier als Kugeln sichtbar werden und sich auch zu kleinen Aggregaten zusammenlagern (Näheres siehe Text).

7. Grenzen der photometrischen Registriermethode nach BORN

Die photometrische Registriermethode nach BORN weist bei der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten Grenzen ihrer Aussagekraft auf.

Abbildung 11 zeigt eine Mikrophotographie eines TRP zur Zeit maximaler Aggregation und der davon erhaltenen Lichttransmissionskurve.

Für dieses Experiment wurde TRP für 5 Minuten bei 37°C mit N(2, 3-di-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure mit einer Plasmaendkonzentration von 0,5 mM vorinkubiert und anschließend mit Kollagen aggregiert. Die Aggregation wird durch diese Substanz mit 91,7 % gehemmt.

Für das in Abbildung 12 dargestellte TRP zur Zeit maximaler Aggregation wurde der gleiche, oben erwähnte Versuchsansatz verwandt, nur daß das TRP mit N(2-chlor-3-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure mit einer Plasmaendkonzentration von 0,5 mM vorinkubiert wurde. Hier ergab sich eine Aggregationshemmung von 100 %.

In diesen beiden erwähnten Experimenten läßt sich keine Lichttransmissionsveränderung erkennen, obwohl die Aggregation durch Kollagen induziert wurde. Man ist daher versucht, dies als "komplette" Aggregationshemmung durch die beiden Fibrinolytika zu deuten.

Untersucht man jedoch im Lichtmikroskop die jeweiligen Thrombozytenaggregationssuspensionen, so erscheint eine Anzahl von kleinen Aggregaten von ca. 20 µ Größe, die durch die photometrische Registriermethode nicht erfaßt werden.

Es ist aus diesem Grunde äußerst wichtig, immer das Mikroskop mitzubenützen, um in dem kritischen Bereich der scheinbaren 100 %-igen Aggregationshemmung bessere Aussagen machen zu können.

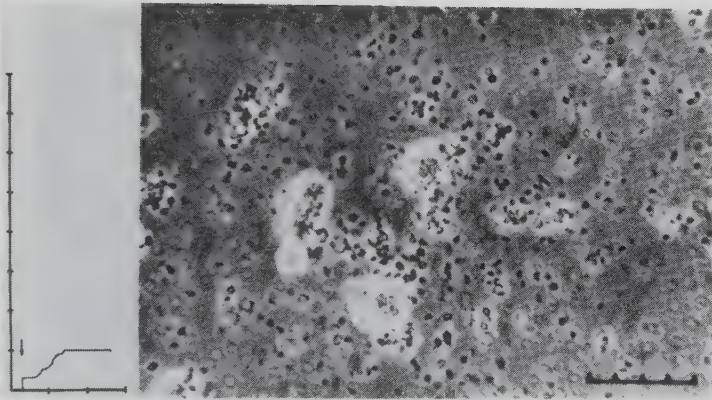


Abb. 11: Mikrophotographie Thrombozyten-reichen-Plasmas zur Zeit maximaler Aggregation mit daraus erhaltener Lichttransmissionskurve (links)
Aggregationshemmung (91,7 %) durch N(2,3-dimethylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure Endkonzentration im Plasma 0,5 mM. Ein Teilstrich: 10 μ ; Pfeil: Kollagenzugabe; Abszisse: ein Teilstrich gleich 5 Minuten; Ordinate: ein Teilstrich 10 relative Lichttransmissionsprozente.

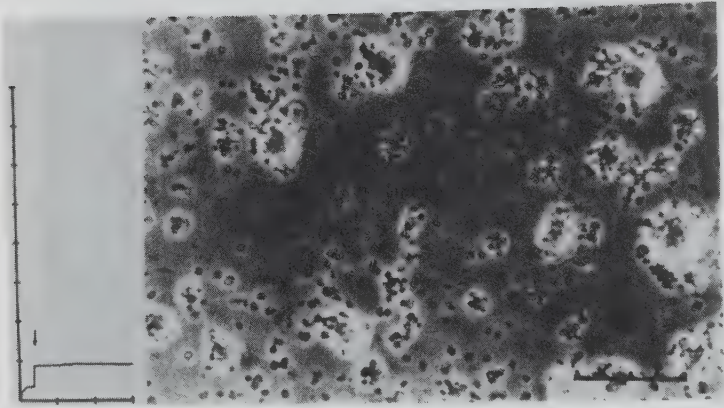


Abb. 12: Mikrophotographie Thrombozyten-reichen-Plasmas zur Zeit maximaler Aggregation mit daraus erhaltener Lichttransmissionskurve (links). Aggregationshemmung (100 %) durch N(2-chlor-3-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure, Endkonzentration im Plasma 0,5 mM. Ein Teilstrich gleich 10 μ ; Pfeil: Kollagenzugabe; Abszisse: ein Teilstrich 5 Minuten; Ordinate: ein Teilstrich 10 relative Lichttransmissionsprozente.

8. Reproduzierbarkeit der photometrischen Methode nach BORN
bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation

Allgemein kann festgestellt werden, daß sich die photometrische Registriermethode der Thrombozytenaggregation nach BORN (1962, 11) trotz ihrer oben angeführten Mängel als ein ausgezeichneter Testaufbau für ein schnelles Übersichtstesten von Verbindungen, die die Kollagen-induzierte Aggregation menschlicher Thrombozyten beeinflussen, eignet.

Die Aggregationshemmung durch die angewandten Fibrinolytika läßt sich mit der erwähnten Methode innerhalb eines gewissen Schwankungsbereiches der Aggregationshöhe reproduzieren.

Besonders deutlich werden diese Schwankungen aus den beiden Versuchsreihen mit Duplikatexperimenten in Abbildung 13 und 14 und zusammenfassend aus Tabellen 7 - 10.

Die Abbildung 13 zeigt eine Experimentenfolge der Kollagen-induzierten Aggregation und deren Hemmung durch verschiedene Plasmaendkonzentrationen (0,1 - 15,0 mM) der Flufenamsäure. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt, um die Aggregationshöhen schwankung innerhalb eines Konzentrationsbereiches aufzuzeigen.

Abbildung 14 zeigt den gleichen Testaufbau wie in der vorhergehenden Abbildung, nur daß hier N(3-trifluormethylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure in den Plasmaendkonzentrationen von 0,1 bis 1,0 mM verwandt wurden.

Warum die Aggregationshöhen der Kontrollversuche (siehe Tabelle 6, Anhang), sowie die der TRP mit Fibrinolytika vorbehandelten (siehe Tabelle 7 - 10, Anhang) selbst in Duplikaten schwanken, konnte nicht untersucht werden.

O' BRIEN et al. (1966, 109) wies in seiner Arbeit nach, daß die Testpersonen in seinen Experimenten verschieden auf die Kollagen-induzierte Aggregation reagieren.

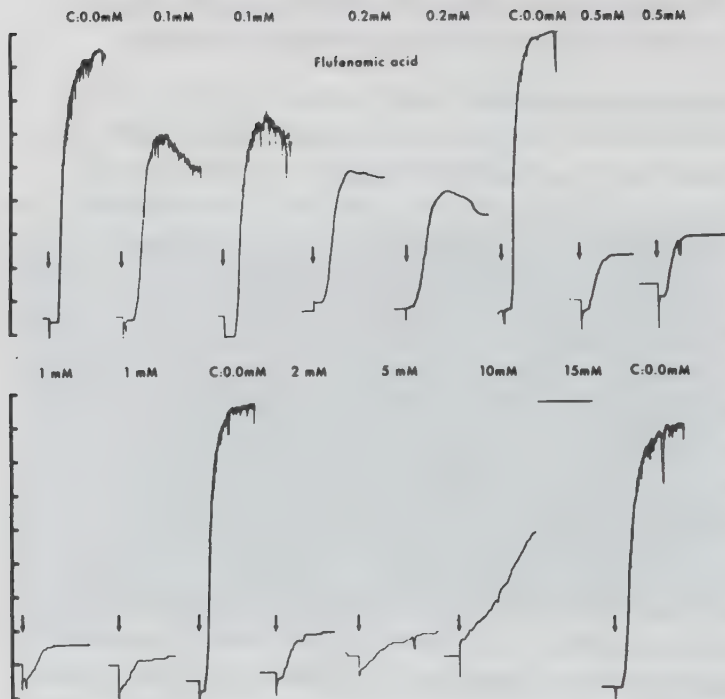


Abb. 13: Versuchsreihe mit Flufenamsäure als Hemmer der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten in frischem Zitratplasma. Pfeil: Kollagenzusatz; Skala links: relative Lichttransmissionsprozente, Zacke in den einzelnen Kurven stellt einen Artifakt dar.

0,0 mM: Kontrolle; Aggregationshemmung in % für folgende Endkonzentrationen im Plasma:

0,1 mM : 23,7 , 19,5 ; 0,2 mM : 52,5 , 58,0 ;

0,5 mM : 80,0 , 78,0 ; 1,0 mM : 87,6 , 86,8 ;

2,0 mM : 82,9 ;

5,0 und 10,0 mM : progressive Lyse

15,0 mM : totale Thrombozytenlyse

Dauer des Gesamtexperimentes 200 Minuten, des Einzelexperimentes : 8 ± 3 Minuten

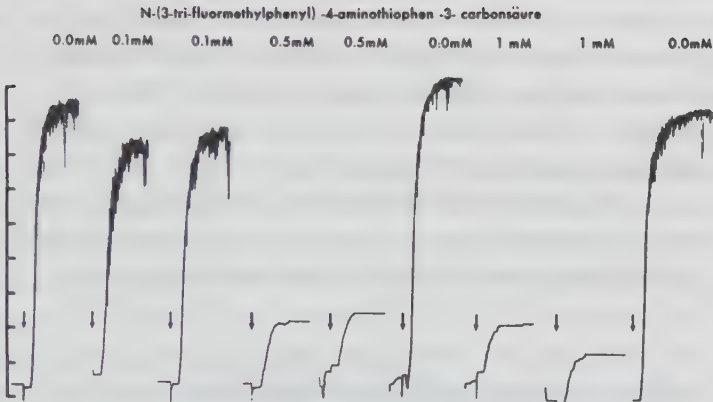


Abb. 14: Versuchsreihe mit N(3-trifluormethylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure als Hemmer der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten in frischem Zitratplasma. Pfeil: Kollagenzusatz; Skala links: relative Lichttransmissionsprozente; Zacke in den einzelnen Kurven stellt einen Artifikat dar.

0,0 mM: Kontrolle, Aggregationshemmung in % für folgende Konzentrationen (Endkonzentrationen) im Plasma:
0,1 mM: 20,9 , 13,3 ; 0,5 mM: 77,3 , 82,0
1,0 mM: 83,4 , 82,9 ;

Dauer des Gesamtexperimentes: 80 Minuten,
des Einzelexperimentes: 7 ± 2 Minuten

Trotz aller Vorsichtsmaßregeln in der Herstellung der Thrombozyten- und Kollagen-Suspension, der Fibrinolytikallösungen, sowie beim Pipettieren, mögen diese Schwankungen auf der verschiedenen Tagesplasmakonstitution und vielleicht auf nicht erkennbare Thrombozytenveränderungen beruhen.

Es zeigte sich in den Experimenten, über die in dieser Arbeit berichtet wird, daß die besten graphischen Darstellungen der Aggregationskurven mit dem dunkelroten Glas- (Evans Nr. 609), sowie mit dem Kodak Wratten Gelatine-Filter (Nr. 70) zu erreichen sind. Tauschte man dagegen einen Grünglasfilter (Evans Nr. 604) oder einen Kodak Wratten Gelatine-Blaufilter (Nr. 47 B) dafür ein, stellten sich große Schwierigkeiten in Form von Nichtregistrierung oder ungenügender graphischer Aufzeichnung der Aggregationskurven ein.

9. Chemische Struktur der Fibrinolytika in Beziehung zu der durch sie bewirkten Aggregationshemmung

In den Tabellen 7 - 10 (Anhang) sind die errechneten Prozentwerte der durch die fibrinolytischen Derivate von Anthranil-, Salicyl-, Thiophen-3-carbonsäure und anderen Verbindungen erreichten Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation aufgeführt.

Die Abbildungen 15 - 18 zeigen die untersten fibrinolytischen Konzentrationen der Verbindungen im Vergleich zu den niedrigsten Molaritäten, mit denen sie noch 50 % der Kollagen-induzierten Aggregation zu hemmen vermögen.

Allgemein kann festgestellt werden, daß die einzelnen Stammverbindungen eine sehr schwache Aggregationshemmung sowie fibrinolytische Aktivität aufweisen. Ihre Hemmwirkungen beginnen erst in hohen Konzentrationen. Dieser Effekt kann jedoch durch unsymmetrische Substitutionen an den Stammverbindungen stark verbessert

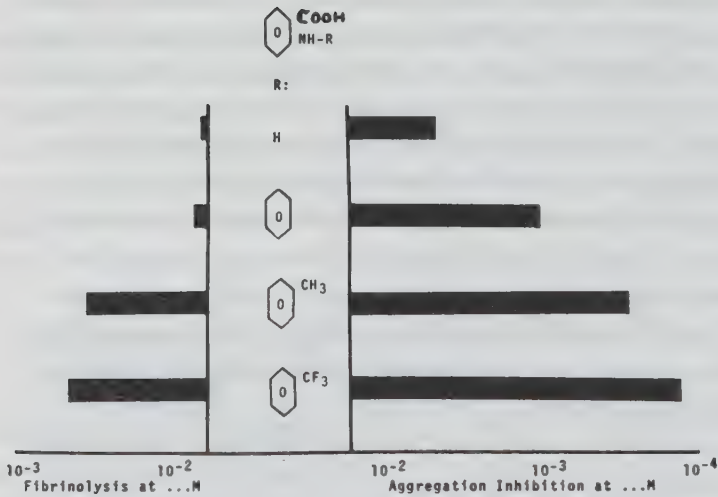
werden. Dadurch ergibt sich eine Steigerung beider Aktivitäten, die aus den Abbildungen 15 - 18 klar ersichtlich werden.

Wird bei der Anthranilsäure (Tabelle 7, Abbildung 15) an der Aminogruppe für ein Wasserstoffatom ein Phenylring substituiert, so verstärkt sich die Aggregationshemmung bei einer Plasmaendkonzentration von 1,0 mM von 0 % auf 78,6 %.

N-phenylanthranilsäure ist jedoch nicht sehr aggregationshemmend unterhalb 0,5 mM. Durch Substitution eines CH_3 -Radikals in Position 3 des Phenylringes bessert sich bei einer Endkonzentration von 0,5 mM die Aggregationshemmung von 30,2 % für N-phenylanthranilsäure weiter auf 56,9 %. Bei einer CF_3 -Substitution in Position 2 des Phenylringes steigert sich die Hemmwirkung auf 68,7 % und in Position 3 (Flufenamsäure) auf 72,9 % bei einer Plasmaendkonzentration von 0,5 mM. Wie aus Abbildung 13 ersehen werden kann, hat Flufenamsäure einen begrenzten Wirkungsbereich, in dem sie aktiv die Kollagen-induzierte Aggregation hemmt. Im Bereich der Plasmaendkonzentration von 0,1 bis 2,0 mM ist eine steigende Aggregationshemmung erkennbar. Bei 5,0 mM und 10,0 mM beginnt eine progressive Thrombozytenlyse, die nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C vollständig ist. Dieses Thrombozyten-reiche Plasma wird bei der genannten Flufenamsäurekonzentration nach 5 Minuten Inkubationszeit vollständig klar und enthält einen Bodensatz, der sich als eindeutige Thrombozytenlyse unter dem Lichtmikroskop darstellt.

Die Methylsubstitutionen am Phenylring in Position 2, 3 oder 4 ergeben keine sehr aktiven, aggregationshemmenden Verbindungen ähnlich wie bei den Di-methylsubstitutionen in Position 2 und 5 oder 2 und 6.

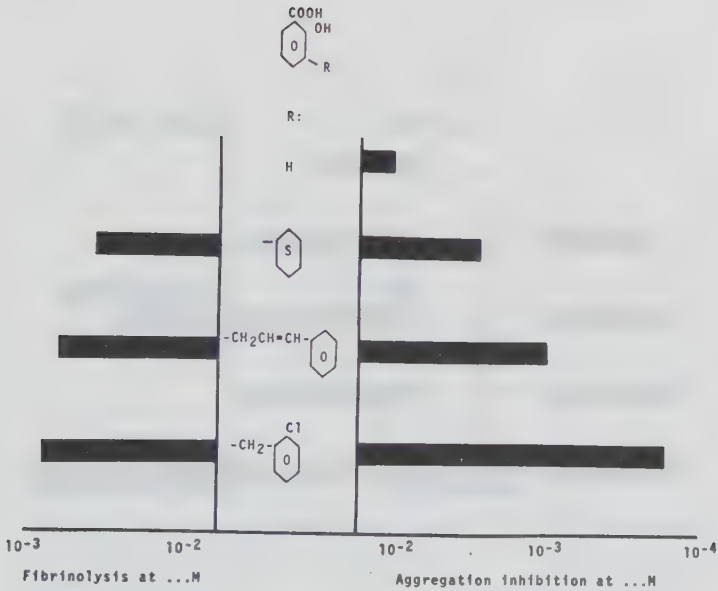
Wird jedoch N(3-trifluormethylphenyl)anthranilsäure in Position 4 oder 6 durch Chlor-Radikal oder in Position 6 durch ein Brom-Radikal substituiert, dann steigt die Aggregationshemmung im Bereich der Plasmaendkonzentration von 0,5 - 1,0 mM wieder an.



(Fibrinolyse beiM)

Aggregationshemmung beiM)

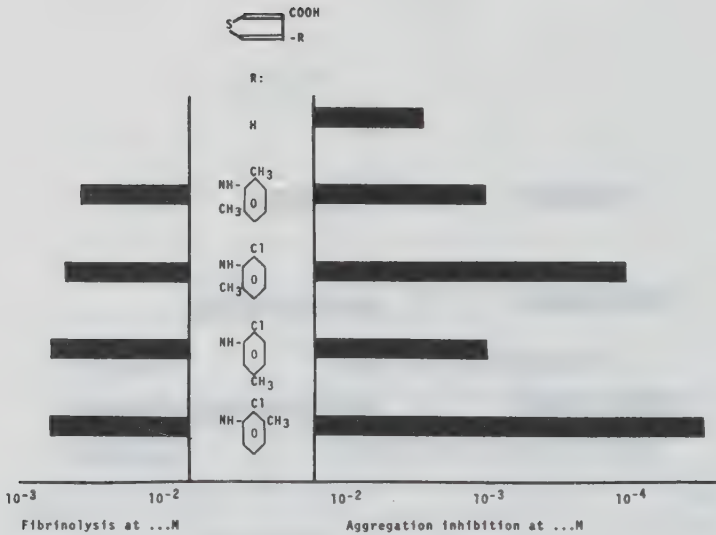
Abb. 15: Phenylanthranilsäure und ihre Derivate. Ein Vergleich zwischen der untersten fibrinolytischen Molarität (gemessen mit der "hanging-clot"-Methode) und der untersten Molarität, die 50 % der Kollagen-(20 µg/ml)induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten in frischem Zitratplasma hemmt (entnommen aus: von KAULLA, THILO 1970, 146).



(Fibrinolyse bei ...M)

(Aggregationshemmung bei ...M)

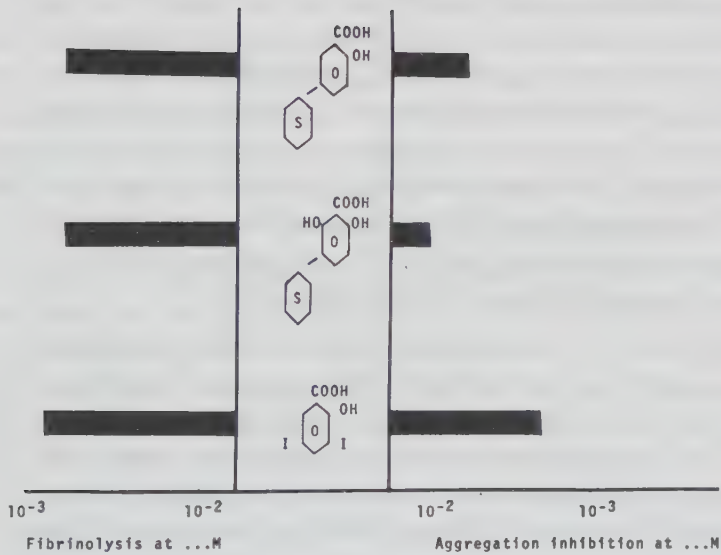
Abb. 16: Salicylsäure und ihre Derivate. Ein Vergleich zwischen der untersten fibrinolytischen Molarität (gemessen mit der "hanging clot"-Methode) und der untersten Molarität, die 50 % der Kollagen-(20 µg/ml)induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten in frischem Zitratplasma hemmt. (entnommen aus: von KAULLA, THILO 1970, 146)



(Fibrinolyse bei ...M)

(Aggregationshemmung bei ...M)

Abb. 17: Thiophen-3-carbonsäure und ihre Phenyl-4-amino-Derivate. Vergleich zwischen der untersten fibrinolytischen Molarität (gemessen mit der "hanging clot"-Methode), die 50 % der Kollagen-(20 $\mu\text{g/ml}$)induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten in frischem Zitratplasma hemmt (entnommen aus: von KAULLA, THILO 1970, 146).



(Fibrinolyse bei ...M)

(Aggregationshemmung bei ...M)

Abb. 18: Synthetische Fibrinolytika mit stärkeren fibrinolytischen Eigenschaften als Thrombozyten-aggregationshemmenden (entnommen aus: von KAULLA, THILO 1970, 146).

Die Prozentwerte der durch Salicylsäure und ihre Derivate erreichten Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation sind in Tabelle 8 (Anhang) zusammengestellt. Auch hier zeigt sich, daß die Stammverbindung (Salicylsäure) in der Aggregationshemmung sowie der Fibrinolyse (siehe Abbildung 16) nicht sehr aktiv ist.

Durch Substitution einer Cyclohexyl-Gruppe in Position 3 und 5 wird die Aggregationshemmung etwas, doch nicht wesentlich verbessert. Durch Substitution eines 2-chlorbenzyl-Radikals in Position 3 der Stammverbindung kann die Aktivität bei einer Plasmaendkonzentration von 1,0 mM auf 79,8 % gesteigert werden. Auch bei dieser Substanz wie bei der bereits erwähnten Flufenamsäure besteht ein begrenzter Wirkungsbereich für die Aggregationshemmung. Bei der Plasmaendkonzentration von 20,0 mM der 2-chlorbenzylsalicylsäure zeigt sich eine beginnende Thrombolyse an.

Wird jedoch ein 2-chlorbenzyloxy-Radikal in Position 3 substituiert, dann geht die Aktivität von 79,8 % (Endkonzentration 1,0 mM) von der vorher erwähnten Verbindung vollständig verloren.

Bei einer Endkonzentration von 0,3 mM entwickelt 3-cinnamylsalicylsäure eine Aggregationshemmung von 23,2 %, die sich bei 2,0 mM auf 95,1 % steigert. Bei einer Substitution von tertiärem Butyl-Radikal in Position 3 und 5 besteht bei einer Endkonzentration von 2,0 mM nur noch ein Hemmeffekt von 36,2 %. Die Jod-Radikal-Substitution in Position 3 zeigt eine bessere Aggregationshemmaktivität (0,5 mM : 22,0 %) als eine in Position 3 und 5 (0,5 mM : 0,0 %).

Tabelle 9 (Anhang) führt die Prozentwerte der Aggregationshemmung durch Thiophen-3-carbonsäure und ihre Derivate auf. Die Abbildung 17 zeigt den Vergleich zwischen der Fibrinolyseaktivität und der untersten Molarität, die zu 50 % die Kollagen-induzierte Aggregation hemmt.

Alle untersuchten Verbindungen dieser Klasse zeigten einen Aggregationshemmeffekt, beginnend bei einer Plasmaendkonzentration von

0,05 mM für die aktivste Verbindung. Bei der Stammverbindung, Thiophen-3-carbonsäure, ist erst in hohen Endkonzentrationen von 2,0 mM während für die Thiophen-2-carbonsäure erst bei einer Konzentration von 8,0 bis 10,0 mM eine Aggregationshemmung sichtbar wird.

Bei einer Endkonzentration von 0,5 mM zeigt sich bei dieser Verbindungsklasse folgendes Bild der Aggregationshemmung:

Zwei CH_3 -Radikale in Position 2 und 6 am Phenylring zeigen eine Hemmaktivität von 16,1 %, die durch Veränderung der Position auf 2 und 3 auf 86,6 % gesteigert werden kann.

Drei CH_3 -Radikale in Position 2, 4 und 6 erreichen 67,6 %, während ein CH_3 -Radikal in Position 3 70,5 % Hemmung aufweist.

Die Einführung von drei Cl- Radikalen in Position 2, 4 und 6 (55,9 %) oder dazu noch ein CH_3 -Radikal in Position 3 (66,3 %) verbessert die Aggregationshemmung nicht wesentlich.

Den besten Erfolg konnten wir durch Kombination eines Cl- mit einem CH_3 -Radikal erreichen: mit einem Cl in Position 2 und einem CH_3 in Position 5 ergab sich 0,0 %, mit einem Cl in Position 2 und einem CH_3 in Position 6 83,2 % und für die aktivste Verbindung (Cl in Position 2 und ein CH_3 in Position 3) wurde bei einer Endkonzentration von 0,5 mM eine Aggregationshemmung von 92,5 % erreicht.

Die Tabelle 10 (siehe Anhang) und Abbildung 18 zeigen noch verschiedene Fibrinolytika, deren fibrinolytisches Potential viel stärker als ihre Aggregationshemmung ist.

Alle sieben Substanzen weisen unterhalb einer Plasmaendkonzentration von 1,0 mM kaum eine Aggregationshemmung auf. Wird an der Benzoesäure in Parastellung ein Jod-Radikal substituiert, erreicht man erst bei 2,0 mM eine sichtbare Aggregationshemmung von 55,0 % und bei 4,0 mM von 78,0 %. Eine Substitution dagegen eines (C_2H_5)₂-C- CH_3 -Radikals in Parastellung reduziert die Hemmaktivität bei 2,0 mM auf 35,2 %.

Wird bei der gamma-Resorcyssäure in Position 5 ein Cyclohexyl-Radikal substituiert, finden wir bei 2,0 mM keine Aggregationshemmung, denn sie wird erst bei 10,0 mM mit einer 68,1 %-igen Hemmung deutlich. Die wohl aktivste Verbindung in dieser Reihe scheint die 3,5-di-tert.-butyl-gamma-Resorcyssäure zu sein, da diese bereits bei 1,0 mM eine Aggregationshemmung von 73,1 % aufweist.

Bis 1,0 mM finden wir bei dem N(2-brom-4-methylphenyl)maleinsäuremonoamid nur eine Hemmaktivität von 20,0 % und bei Methylendi-beta-oxy-naphthoesäure erst bei 4,0 mM von 63,3 %.

10. Einfluß der Fibrinolytika auf die Latenzperiode

Um den Einfluß der Fibrinolytika auf die Latenzperiode, als auf die Zeitspanne von der Zugabe der Kollagensuspension bis zur ersten großen, registrierten Lichttransmissionsveränderung der Aggregationskurve zu untersuchen, wurden diese Zeitwerte mit denen an den Kontrollaggregationskurven gemessenen verglichen.

Durch statistische Methode konnte keine signifikante Verkürzung oder Verlängerung der Latenzperiode und somit eine Beschleunigung oder Verzögerung der Thrombozytenaggregatbildung, bewirkt durch Vorinkubierung mit den Fibrinolytika, im Vergleich zu den Kontrollen gefunden werden.

11. Einfluß der Fibrinolytika auf die Desaggregation

Es besteht der Wunsch, Thrombolytika zu entwickeln, die auch noch nach einer stattgefundenen Thrombozytenaggregation die Fähigkeit besitzen, eine Desaggregation, also eine Auflösung der Thrombozytenaggregate hervorzurufen. Aus diesem Grunde wurde die Desaggregationswirkung dreier Fibrinolytika bei der Kollagen-induzierten Aggregation untersucht.

N(2-chlor-3-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure, Flu-fenamsäure und 3-(2-chlorbenzyl)salicylsäure wurden in einer Plasmaendkonzentration von 1,0 mM kurz nach dem Zeitpunkt maximaler Aggregation durch Kollagen dem Thrombozyten-reichen-Plasma zugegeben. Alle drei Substanzen erbrachten in dem nachfolgenden Zeitraum von 20 Minuten keine Desaggregation.

12. Einfluß der Fibrinolytika auf die Endotoxin-induzierte Thrombozytenaggregation

Durch bakterielle Endotoxine, die chemisch Lipopolysacchariden entsprechen, kann beim Menschen in vivo schwere septische Schockzustände, die mit einer hohen Letalität verbunden sind (WEIL et al. 1964, 155), und auch Thrombozytenaggregation hervorgerufen werden. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß der Fibrinolytika auf die Endotoxin-induzierte Aggregation in vitro untersucht, in der Hoffnung, dieses Phänomen zu hemmen.

TRP wurde mit N(2,6-di-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure mit einer Plasmaendkonzentration von 1,0 und 2,0 mM für fünf Minuten bei 37°C vorinkubiert und nach einer 2 Minuten langen Equilibrationsperiode durch 0,05 ml Endotoxin (E.coli Reizstoff Sa 1083 II, Wander) aggregiert.

Die Aggregation fand ohne verlängerte Latenzperiode statt. Dieses Fibrinolytikum konnte die Aggregation nicht hemmen im Gegensatz zu seiner Hemmung bei der Kollagen-induzierten Aggregation von 77,9 % (1,0 mM) und 85,8 % (2,0 mM).

Wurde diese Substanz sofort nach Erreichung maximaler Aggregationshöhe in der angegebenen Konzentration zugegeben, konnte keine Desaggregation erreicht werden.

Werden die Thrombozytenaggregate dieses Experimentes unter dem Lichtmikroskop betrachtet, ergeben sich im Gegensatz zu den Kontrollaggregaten bei der Kollagen-induzierten Aggregation fast nur

runde Aggregatformen, die einen Zentrilisationskern vermuten lassen, um den sich die einzelnen Thrombozyten bei der Aggregatbildung herumlagern.

13. Einfluß der Fibrinolytika auf die Ultrastruktur der Thrombozyten vor und nach der Kollagen-induzierten Aggregation

Aus 675 elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Abbildungen EM 1 - 5 zusammengestellt, um damit einen Überblick über die Wirkungsweise der synthetischen Fibrinolytika in der Plasmaendkonzentration von 1,0 mM auf die Innenstruktur der Thrombozyten nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C und einer anschließenden Kollagen-induzierten Aggregation zu geben.

Bei der ohne Fibrinolytika vorinkubierten Thrombozytenkontrollsuspension (EM 1. Nr. 1-3) ergeben sich keine sichtbaren strukturellen Veränderungen. Alle Innenstrukturen wie Mitochondrien, Glykogengranula, alpha-Granula, Vakuolen, Mikrotubuli und limitierende Zelldoppelmembran (auch Einheitsmembran genannt) sind erkennbar. Teilweise weist die Zellmembran Brüche, gewellte Verlaufsform mit Unregelmäßigkeiten auf.

Deutlich läßt sich um die Thrombozyten eine "wolkige Substanz" erkennen, die vielleicht mit den absorbierten Plasmaproteinschichten identisch sein könnte.

Es ergeben sich durch die Vorinkubierung mit gepufferter NaCl-Lösung, in der auch die Fibrinolytika gelöst werden, keine Strukturveränderungen. Die Mikrotubuli sind durch die Vorinkubierung nicht verschwunden und stellen sich als Ringe in Nr. 2 an beiden Polen sowie in Nr. 3 als Streifen dar. Das unterschiedliche Sichtbarwerden dieser Ringe beruht auf den verschiedenen Schnittebenen in den Thrombozyten.

Die alpha-Granula mit unterschiedlicher Größe und Formen lassen sich die exzentrisch gelagerte, elektronenoptische Verdichtung, ge-

nannt "Ochsenauge" (JONES 1960, 70), erkennen. Manche scheinen sich von ihrer umgebenden Membran zu lösen, sowie lassen deutlich Membranbrüche erkennen.

Auffällig mag vielleicht an diesen Kontrollen die teilweise bereits fortgeschrittene Vakuolisierung der Zellen sein.

Die Kollagensuspension erzeugt in dem Thrombozyten-reichen-Plasma eine schnelle, irreversible Aggregation (EM 1, Nr. 4-6). Deutlich treten die Kollagenfasern mit ihrer weiten, charakteristischen periodischen Streifung hervor, die manchmal ohne erkennbare Zwischenräume an den Thrombozytenmembranen anliegen.

Verlust der Innenstruktur, Zellvolumenvergrößerung, sowie Ansammlung interzellulärer Bestandteile im Zentrum der Aggregate sind erkennbar. Die Außenmembranen der Zellen sind oft gut erhalten. Eine feinförmige, nicht differenzierbare Zwischensubstanz befindet sich zwischen den angrenzenden Zellmembranen. In Nr. 4 und 6 erkennen wir eine fast abgeschlossene Phagozytose eines Kollagenteilchens. Glykogen- sowie alpha-Granula sind noch erhalten, doch lassen sich dagegen keine Mitochondrien mehr finden.

Die Abbildung EM 2 Nr. 1 - 3 zeigt den Einfluß der Flufenamsäure bei einer Endkonzentration von 1,0 mM nach der Kollagen-induzierten Aggregation.

Deutlich sind die Innenstrukturen wie Mitochondrien, alpha- oder Glykogen-Granula erhalten. In allen drei Aufnahmen ist eine Vergrößerung der Zellvakuolen zu erkennen. Kanäle durchsetzen die Thrombozytenstruktur mit teilweiser Verbindung zur Zellmembran, in die sich teilweise die alpha-Granula-Substanz ergießt.

In Nr. 1 sieht man eine Kollagenfaser, die aber nicht mehr so nahe an die Thrombozytenmembran herantritt oder herantreten kann wie bei den Kontrollaggregaten. Zwischen den einzelnen Thrombozyten, die hier lockere Aggregate darstellen, sind fadenförmige Verbindungen zwischen den limitierenden Außenmembranen festzustellen.

In Nr. 2 treten aus dem aus drei Thrombozyten bestehenden Aggregat an der großen Membranbruchstelle Mitochondrien, alpha- und Glykogen-Granula aus. In der linken, oberen Ecke befindet sich das Membranskelett eines Thrombozyten.

Bei der Vorinkubierung mit 3,5-di-tert.-butyl-gamma-Resorcyssäure (EM 2, Nr. 4 - 6) mit Thrombozyten-reichem-Plasma ergeben sich bereits starke Veränderungen der Thrombozytenstruktur.

Die fadenförmigen Verbindungen zwischen den Zellmembranen werden häufiger. Alpha-Granula, Vakuolen sowie Mitochondrien konzentrieren sich an den Verbindungsstellen der Thrombozyten (Nr. 4). Die alpha-Granula zeigen verschiedene Auflösungsstadien wie Verlust des Ochsenauges, der Innensubstanz oder ihrer begrenzenden Doppelmembran.

Nach der Vorinkubierung mit 5-cyclohexylsalicylsäure (EM 3, Nr. 1 - 3) ist die viele, faserartige Zwischensubstanz besonders auffällig. Bemerkenswert ist die unterschiedliche Größe der Thrombozyten, die nicht allein auf die verschiedenen Schnittebenen in den Thrombozyten zurückgeführt werden kann.

Erkennbar sind Mikrotubuli als Ringe, sowie als Streifen und in Nr. 1 mit dazwischen liegenden Mitochondrien, mit dem freien Raum kommunizierende Kanäle und Vakuolen, in die die Glykogen-Granula einbrechen, sind weiterhin festzustellen.

Die Thrombozytenveränderungen durch die Kollagenaggregation kann durch diese Verbindungen nicht aufgehalten werden, wie sich auf den Aufnahmen Nr. 4 - 6 zeigt.

Deutlich tritt die starke Vakuolisierung, die vielen die Außenmembran durchbrechenden Kanäle, sowie das leere, geschrumpfte Membranskelett in der Nähe einer Kollagenfaser in Nr. 4 hervor. In Nr. 5 scheinen die Innenstrukturanteile zu schwellen und sich zu konzentrieren. In Nr. 6 findet sich ein kontrollähnliches Aggregat neben einem fast "normalen" Thrombozyten.

Im Gegensatz zu den Kontrollaggregaten werden auch hier alle Thrombozytenstrukturanteile gefunden.

Abbildung EM 4 zeigt den Einfluß der Vorinkubierung TRP mit N(2-chlor-3-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure (Nr. 1 - 3) und nach der Kollagenaggregation (Nr. 4 - 6).

Die Innenstruktur ist bei der Vorinkubierung gut erhalten. Es lassen sich alle Strukturen erkennen wie Mikrotubuli als Ringe in Nr. 1 und als Streifen in Nr. 2, insgesamt acht Mitochondrien, viele alpha-Granula in verschiedenen Auflösungsstadien, Kanäle, die die Außenmembran durchbrechen, sowie Aufquellung oder Verbreiterung des wahrscheinlichen Plasmaproteinüberzuges. Auffällig ist die große Glykogen-Granula-Konzentration in Nr. 1.

Durch Aggregation ergeben sich Veränderungen in Richtung stärkerer faserartiger Verbindungen zwischen den einzelnen Thrombozyten, stärkerer Vakuolisierung und beginnende Zerstörung und Auflösung einzelner Thrombozyten (Nr. 5, 6).

Die alpha-Granula verändert ihre Form und elektronenoptische Dichte (Nr. 5), "fließen" aus ihrer Umhüllung aus (Nr. 4) oder werden durch die starke Glykogengranulaballung verdrängt (Nr. 5). Die limitierende Zellaußenmembran ist an den Verbindungsstellen oft unscharf begrenzt oder "aufgequollen" (Nr. 4) oder es "fließen" Zellinnensubstanzen aus, die dadurch diese wolkige Membranverbreiterung verstärken könnten.

In Abbildung EM 5 sehen wir den Einfluß von N(2,6-dimethylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure nach der Vorinkubierung (Nr. 1 - 3) und nach der Kollagenaggregation (Nr. 4 - 6).

Die limitierenden Zellmembranen sind gut erkennbar, oft scharf begrenzt (Nr. 1), obwohl sich auch hier Verbreiterung, Überlappungen und wolkige Aufquellung erkennen lassen (Nr. 2). Auffällig ist in Nr. 1 und Nr. 2 die feine, vesikuläre Zellinnenstruktur. Die alpha-Granula fließen aus ihrer brüchig gewordenen Umhüllung aus (Nr. 1). Es

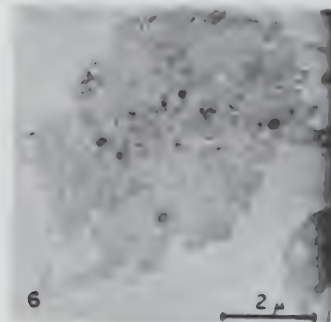
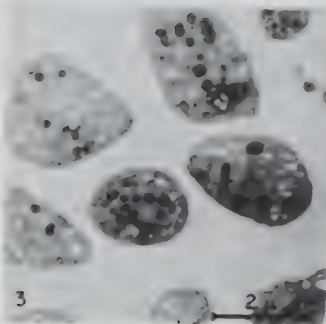
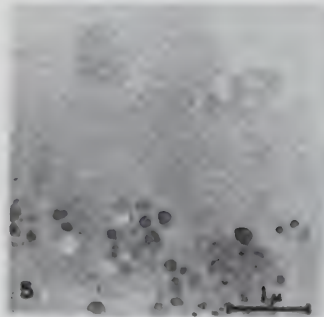
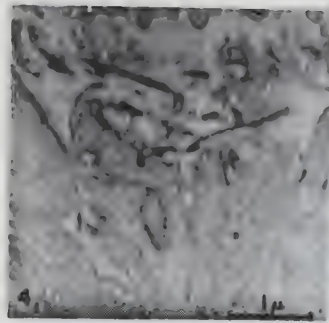
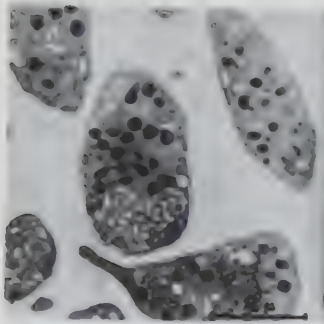
wurden insgesamt 10 Mitochondrien gezählt und viele Kanäle, in denen sich teilweise Glykogen-Granula oder alpha-Granula ergießen. Verbindungen unter den einzelnen Zellen zeigen wieder diese fadenförmige Struktur mit Aufquellung der gegenüberliegenden Membranstellen.

Kein großer Unterschied läßt sich zwischen den Aufnahmen bei der Vorinkubierung und nach der Aggregation (Nr. 4 - 6) feststellen.

Alle Strukturinnenanteile sind zu finden.

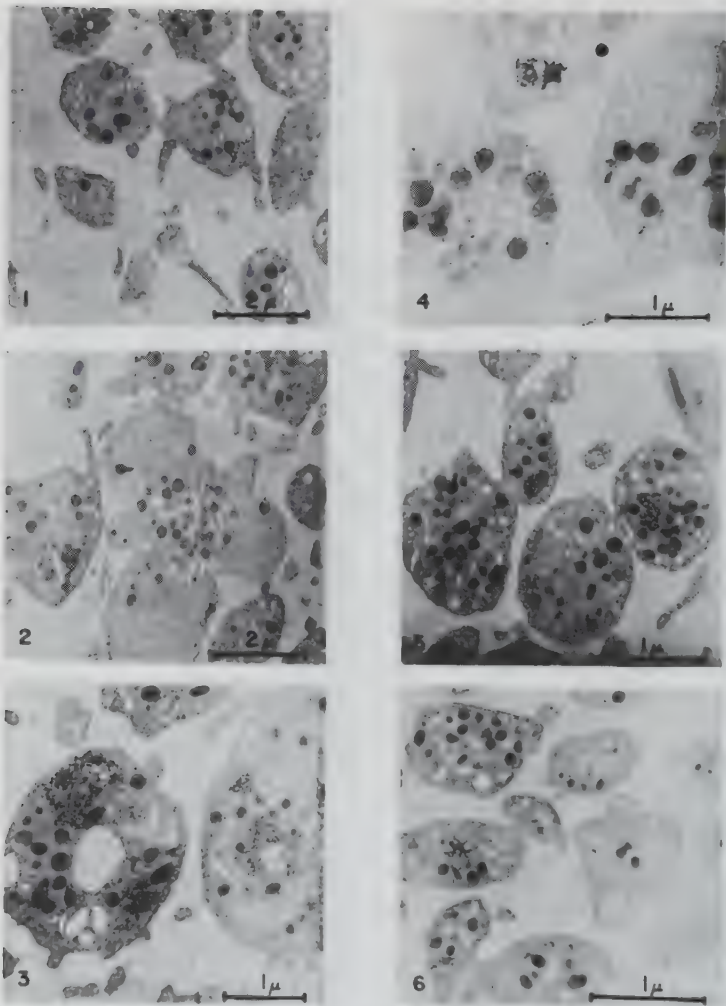
Alpha-Granula in besonders gehäufter Anzahl in Nr. 6 und insgesamt 7 Mitochondrien sind in diesen drei Aufnahmen zu erkennen. Auffallend ist die starke Glykogen-Granula-Konzentration in Nr. 4.

Die Kollagenfasern liegen weit ab von den Zellmembranen.



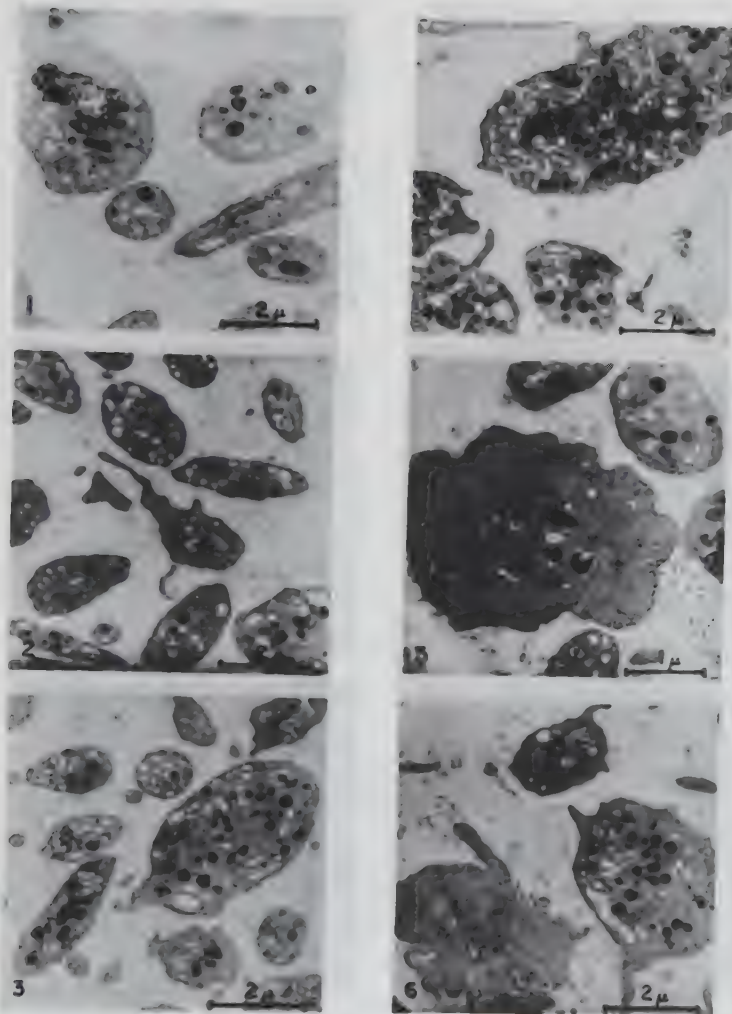
EM I

EM I: Kontrolle: Thrombozyten-reiches-Plasma ohne Fibrinolytika Nr. 1 - 3, Nr. 4 - 6 nach der Kollagen-induzierten Aggregation



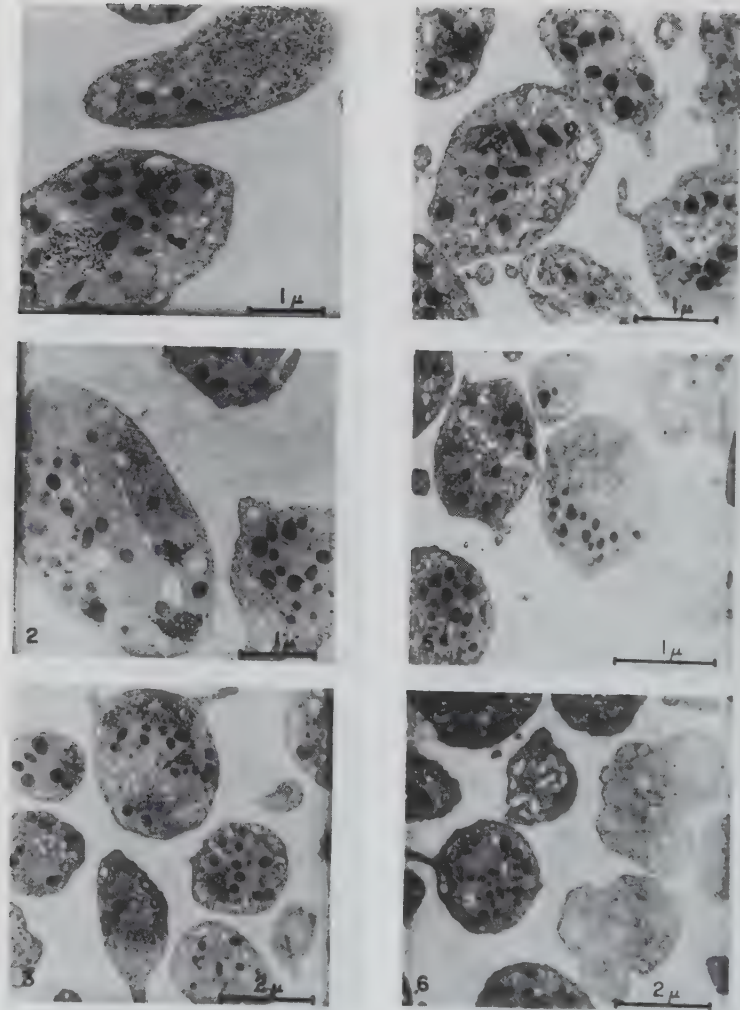
EM 2

EM 2: Flufenamsäure (Endkonzentration 1,0 mM) nach der Kollagen-induzierten Aggregation Nr. 1 - 3 3,5-di-tert.-butyl-gamma-Resocylsäure (Endkonzentration 1,0 mM) ohne Kollagen Nr. 4 - 6



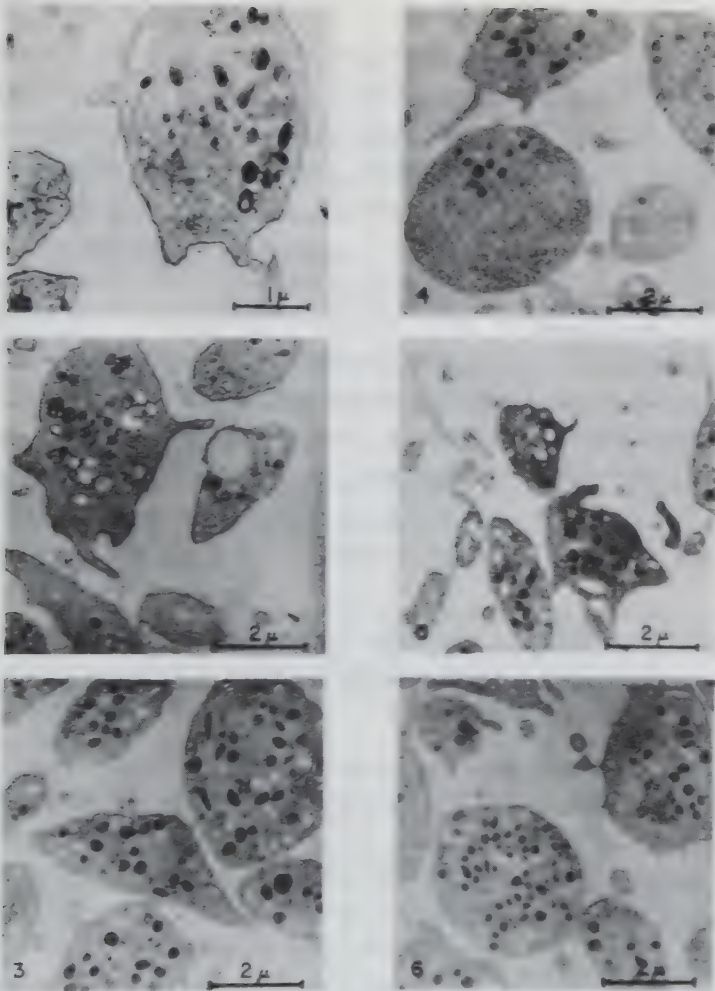
EM 3

EM 3: 5-cyclohexylsalicylsäure (Endkonzentration 1,0 mM) nach der Vorinkubierung Nr. 1 - 3 und nach der Kollagen-induzierten Aggregation (Nr. 4 - 6)



EM 4

EM 4: N(2-chlor-3-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure nach der Vorinkubierung (Nr. 1 - 3) und nach der Kollagen-induzierten Aggregation (Nr. 4 - 6), Endkonzentration 1,0 mM



EM 5

EM 5: N(2,6-di-methylphenyl)-4-aminothiophen-3-carbonsäure
nach der Vorinkubierung (Nr. 1 - 3) und nach der Kollagen-
induzierten Aggregation (Nr. 4 - 6), Endkonzentration
1,0 mM

D. DISKUSSION

Die Thrombose ist heute noch immer eine der gefürchtetsten Komplikationen in der Medizin (GUNNING et al. 1964, 43). In den zahlreichen und vielfältigen Theorien zur Thrombusentstehung werden immer wieder die Thrombozyten und besonders ihre Aggregations- und Adhäsions-Fähigkeit an erster Stelle genannt, die zu einer Thrombusformation führen.

Bereits EBERTH und SCHIMMELBUSCH (1887, 36) stellten zu ihren Experimenten fest, daß die Thromben im Anfangsstadium nur aus Blutplättchen bestehen würden.

Es wird also in der Forschung zwischen dem zuerst entstehenden weißen Thrombozytenthrombus und dem später daraus resultierenden roten Fibrinthrombus unterschieden.

Bis vor kurzem richtete sich die Forschung auf die Hemmung und Auflösung der intravasalen Fibrinbildung, um damit die Verhinderung sowie eine Behandlungsmöglichkeit thromboembolischer Krankheiten zu erreichen.

Aus diesem Grunde wurden die Antikoagulantien zur Verhinderung der Fibrinausbreitung, später dann die enzymatischen, thrombolytischen Medikamente, die zur Auflösung des Thrombus dienen sollten, entwickelt. Weder Antikoagulantien in therapeutischen Dosen (POOLE, FRENCH 1961, 117; MURPHY et al. 1961, 93) noch thrombolytische Medikamente (CRONBERG 1968, 23) verhindern oder blockieren die Thrombozytenadhäsion und ihre Aggregation. WILSON et al. (1967, 159) berichtete sogar von einer Förderung der Thrombozytenaggregation im Röhrensystem nach Chandler durch niedrige Konzentration von Streptokinase.

Diese Ineffektivität der thrombolytischen Medikamente bei der Verhinderung und Behandlung thromboembolischer Krankheiten gewinnt besondere Bedeutung in okklusiven Arterienkrankheiten, da hier der weiße Thrombus die Hauptläsion darstellt.

Weiterhin diskutiert man einen Zusammenhang zwischen Thrombozyten und der Atherosklerose (MUSTARD et al. 1961, 95), da es durch Plättchenanlagerung auf die Gefäßwand zu einer Schädigung der darunter liegenden Endothel- und Intimaschicht kommen könnte, womit eine Voraussetzung zur Entstehung der Atherosklerose gegeben wäre.

Besonders störend erweist sich die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten bei der unerwünschten Verschließung vaskulärer Katheter (JACOBSEN 1969, 65).

Somit laufen die gegenwärtigen Entwicklungsarbeiten für wirksamere Antithrombotika in zwei getrennte Richtungen: einmal den roten Thrombus zu beseitigen und zum anderen die Bildung des weißen zu verhindern. Man bemüht sich also um die Thrombolyse einerseits und um die Adhäsions- und Aggregationshemmung der Thrombozyten andererseits.

Pharmazeutika, die diese Eigenschaften in sich vereinigen, sind bisher unbekannt. Die intravenös applizierbaren, enzymatischen Thrombolytika können weder oral, noch vorbeugend verabreicht werden und sind teuer.

Mit den synthetischen Thrombolytika hofft man, diese Beschränkung zu beseitigen.

Durch Entdeckung synthetischer Fibrinolytika (von KAULLA 1963, 148; THILO 1970, 152) bietet sich die Möglichkeit neuer Entwicklungen an, die gerade beginnt, aufgegriffen zu werden.

Durch die genannten chemischen, organischen Verbindungen wird ein Teil der Forderungen erfüllt: einmal entwickeln sie fibrinolytische Aktivität und damit Auflösung des Fibringerinnsels und zum anderen verhindern sie die Adenosindiphosphat-, Thrombin- und Kollagen-induzierte Aggregation menschlicher Thrombozyten.

Ihre Wirkungsweise in der Fibrinolyse beruht nicht allein auf einer direkten Aktivierung von Plasminogen, sondern sie unterdrücken die

Antiplasmin- (von KAULLA, LEPPKE 1969, 151) und die Anti-Aktivator-Aktivität (AOKI, von KAULLA 1969, 4; 1970, 6) im Blut. Ebenso zeigen sie eine verhältnismäßig selektive Inaktivierung des C' 3-Komplexes und eine direkte Modifizierung des beta-1-Globulins (AOKI, von KAULLA 1969, 5).

Vorläufige Untersuchungen haben gezeigt, daß die genannten Verbindungen konzentrationsabhängig die Adenosinphosphat- und Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation im menschlichen Zitratplasma in vitro zu hemmen vermögen (MOLINAS, von KAULLA 1969, 90). Ihre Wirkungsweise bei der Verhinderung der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten in vitro soll auf einer wahrscheinlichen Thrombozytenfermenthemmung beruhen (THILO, von KAULLA 1970, 144).

Somit wäre die theoretische Voraussetzung für echte Antithrombotika gegeben und wahrscheinlich finden sich unter den in dieser Arbeit besprochenen Verbindungsklassen oder unter ähnlichen asymmetrischen Derivaten anderer Stammverbindungen noch weitaus aktive Substanzen.

Die Vorzüge der in diesen Versuchen angewandten photometrischen Registriermethode nach BORN zeigen sich in der Einfachheit der experimentellen Handhabung, sowie der sehr guten Möglichkeit, ein schnelles Übersichtstesten von Verbindungen, die die Kollagen-induzierte Aggregation beeinflussen, durchzuführen.

In der Literatur wird immer wieder eine Standardisierung der Thrombozytenzahl pro Milliliter Plasma gefordert, um dadurch eine konstante Höhe der Aggregationskurven zu erreichen. WILNER et al. (1968, 158) wies in seinen Experimenten nach, daß unterschiedliche Höhe der Aggregationskurven mit steigender Thrombozytenkonzentration pro Milliliter Plasma bei Zugabe konstanter Kollagenmengen zustandekommen.

In den hier berichteten experimentellen Aggregationsversuchen schien

jedoch keine Standardisierung der Thrombozytenkonzentration notwendig zu sein, da ein sehr niedriger Korrelationskoeffizient von $r = 0,021$ (siehe Abbildung 5) zwischen den genannten zwei Parameter errechnet wurde.

Der große Nachteil der Methode nach BORN ist die verminderte Sensitivität im Bereich der kleinen, lichtmikroskopisch erst erfaßbaren Thrombozytenaggregaten zu sein, wie aus Abbildung 11 und 12 zu ersehen ist. Unterhalb einer gewissen Aggregatgröße von ca. 20μ wird kein Anstieg der Aggregationskurven mehr registriert, und daher liegt der Versuch nahe, dies als 100 % Aggregationshemmung zu deuten. Dies entspricht jedoch keineswegs den Tatsachen, was sofort offenkundig wird, wenn man die Plättchensuspension auch unter dem Lichtmikroskop untersucht. Dann zeigen sich noch kleine Plättchenaggregate.

Unsere Beobachtungen stimmen gut mit denen von REUTER et al. (1968, 120) überein, die empfehlen, im Bereich kleiner Aggregate immer das Lichtmikroskop zu benützen, da diese von der photometrischen Methode nach BORN nicht erfaßt werden.

Wie sich aus Abbildung 6 und Tabelle 4 - 6 ersehen läßt, besteht eine unterschiedliche Reaktionsweise der Thrombozyten von den einzelnen Testpersonen auf die Kollagen-induzierte Aggregation.

Bei der Berechnung der Parameter der Aggregationskontrollkurven ergeben sich für die Probanden unterschiedliche Durchschnittswerte für die Latenzperiode, maximale Deflektion und Aggregationshöhen. Eine Antwort für diese Unterschiede kann nicht gegeben werden.

O' BRIEN et al. (1967, 109) bemerkte in seinen Kollagen-induzierten Aggregationsexperimenten ähnliche Schwierigkeiten, ohne eine Antwort darauf geben zu können. Auch HARRISON et al. (1967, 48) war es nicht möglich, die Plasmainstabilität zu verhindern, noch ihre Ursachen zu ergründen, denn eine Standardisierung ist notwendig, um verschiedene Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Wie sich aus den Experimenten ergeben hat, ist eine konzentrations-

abhängige Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten durch synthetische Fibrinolytika gegeben. Diese synthetischen Verbindungen wirken innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches aggregationshemmend, unterhalb dieses Bereiches ergibt sich keine sichtbare Veränderung, während bei höheren Plasmaendkonzentrationen die Neigung zur Aggregationsinduktion (MOLINAS, von KAULLA 1969, 90) oder Zerstörung durch Lyse der Thrombozyten (siehe Abbildung 13) sich einstellen kann.

Abhängig von der Substitutionstelle, der Art des Radikals und der Stammverbindung hemmen die synthetischen Fibrinolytika die Kollagen-induzierte Aggregation unterschiedlich stark. Weiterhin weisen sie eine unterschiedliche Aggressivität gegenüber den Thrombozyten und den Erythrozyten auf.

Die weitaus zellaggressiveren Salicylsäure- und gamma-Resorcyssäure-Derivate benötigen viele höhere Plasmaendkonzentrationen für eine vergleichbare Aggregationshemmung, die bei den Anthranilsäure- und Thiophen-3-carbonsäure-Derivaten bereits in niedrigeren Molaritäten erreicht wird.

Als beste Verbindungsklasse haben sich die Thiophen-3-carbonsäure-Derivate erwiesen, da sie bereits für das aktivste Präparat eine Aggregationshemmung bei einer Endkonzentration im Plasma von 0,05 mM bewirken und weitaus zellschonender sind.

Wird Kollagensuspension auch mit niedrigen Fibrinolytikakonzentrationen für 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert, verliert das Kollagen seine aggregationsinduzierende Kraft (siehe Tabelle 3). Wird die Suspension jedoch allein vorinkubiert, zeigt sich kein Unterschied zu den normalen Kontrollexperimenten.

Auch wenn die Konzentrationen hoch erscheinen mögen, wäre es dennoch theoretisch möglich, daß in den niedrigeren Konzentrationen die chemischen Substanzen in kurzer Zeit die Adenosintriphosphatase-Aktivität des Kollagens (KRANES, GLIMCHER 1962, 76) zerstö-

ren und dadurch eine Veränderung des Kollagenmoleküls bewirken. Als Folge wäre eine mangelnde Kontaktfähigkeit der Kollagenfaser mit der Thrombozytenmembran zu diskutieren, wodurch sich eine reduzierte Adenosindiphosphatfreisetzung aus den Zellen ergibt, die dann in einer verminderten Thrombozytenaggregation resultiert.

Dazu sei noch erwähnt, daß sich durch diese Inkubierung ebenfalls eine Veränderung oder Zerstörung der dunklen Streifen in der Kollagenfaser ergeben könnte, an die sich die Thrombozyten nach HOVIG et al. (1968, 61) besonders anlagern.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellen einen Versuch dar, Einblick in die Wirkungsweise der synthetischen Fibrinolytika bei der Thrombozytenaggregationshemmung zu erhalten.

Verallgemeinert kann gesagt werden, daß die Fibrinolytika unabhängig von ihrer Verbindungsklasse, in einer Plasmaendkonzentration von 1,0 mM einen gewissen Teil der Thrombozytenaggregation hemmen und Thrombozyteninnenstruktur zum großen Teil erhalten. Dies zeigt sich deutlich gegenüber den Kontrollaggregaten (siehe Abbildung EM 1).

Jedoch lassen sich bei den Sylicylsäure- und gamma-Resorcyllsäure-Derivaten mehr kontrollähnliche Aggregate finden. Diese Ergebnisse stehen deutlich mit den lichtmikroskopischen Befunden und ihrer größeren Zellaggressivität in Zusammenhang.

Bei der Flufenamsäure (EM 2, Nr. 1 - 3) herrscht eine lockere Verbindung zwischen den Thrombozyten vor, wie sich dies auch bei den Thiophen-Derivaten beobachten läßt.

Auffällig ist die Aufquellung oder wolkenartige Verbreiterung der limitierenden Einheitsmembran. Sie finden sich besonders häufig in der Nähe der Kollagenfasern, sowie an den gegenüberliegenden Verknüpfungsstellen zweier Thrombozyten.

Es könnte hier eine Einlagerung der Verbindungen in die Makromoleküle der Zelle, wie es auch GOLDMAN (1969, 41) für das Halogen

Fluor nachwies, oder auch eine Denaturierung der adsorbierten Plasmaproteine vorliegen. Eine Veränderung der Adenosin-diphosphat-Rezeptoren (BORN 1962, 11), die für die ADP-Brückenbildung bei der Aggregation notwendig sind, könnte ebenfalls diskutiert werden.

Deutlich treten in diesen elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Meinung des Verfassers die verschiedenen Auflösungsstadien der alpha-Granula hervor. In ihnen soll sich nach JOHNSON et al. (1959, 69) Plättchenfaktor 3, nach MARCUS et al. (1966, 85) lysosomale Enzyme und nach WHITE, KRIVIT (1965, 157) Thrombozyten-ATPase befinden.

Der gekörnte Inhalt der alpha-Granula löst sich von der ungebundenen Membran ab, ergießt sich in Kanäle, die die Einheitsmembran durchbrechen, oder gehen ohne sichtbare Verbindung nach außen verloren. Das "Ochsenauge" (JEAN et al. 1963, 67) bleibt zurück, kann sich auch in kleine Teile aufspalten oder in den entstandenen Vakuolen vergrößern. Es wäre möglich, daß die ausfließende alpha-Granula-Substanz durch die Fibrinolytika verändert, gebunden, inaktiviert oder zerstört wird, so daß eine etwaige Aggregationsförderung und Thrombinbildung dadurch verhindert wird.

Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wird jedoch klar der Beweis erbracht, daß die synthetischen Fibrinolytika nicht durch eine einfache Zerstörung der Innenstrukturen der Thrombozyten die Aggregation verhindern, sondern daß sie eher als Enzyminhibitoren und Hemmung der aggregationsfördernden Faktoren wirken.

Trotz der gegebenen Erklärungsversuche bleibt die wichtige Frage offen, warum zerstörte, stark vakuolisierte oder nur noch leere Membranskelette neben "anscheinend gesunden" Thrombozyten beobachtet werden.

Man kann daraus schließen, daß die Fibrinolytika nicht nur an einer Stelle an den Thrombozyten angreifen, sondern eine größere Anzahl von Angriffspunkten haben müssen.

Aus dem Gesagten sollen nun folgende mögliche Theorien für die Wirkungsweise der Fibrinolytika bei der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten in vitro als Erklärungsversuche entwickelt werden:

- 1) Die Verbindungen verhindern die Freisetzung von ADP aus den Thrombozyten, sei es durch:
 - a) Abbauhemmung von ATP zu ADP, so daß kein ADP zur Freisetzung und Aggregationsförderung vorhanden ist.
 - b) Eingreifen in den Mitochondrienstoffwechsel, also als Enzyminhibitoren.
 - c) Veränderung der ADP-Rezeptoren an der limitierenden Einheitsmembran.
- 2) Die Verbindungen lagern sich auf Grund ihrer elektrischen Ladung an oder in die Zellmembran ein, bewirken dadurch eine elektrophoretische Veränderung der Thrombozyten und verhindern dadurch einen Kontakt mit den Kollagenfasern, wodurch sich keine Freisetzung von Innenstrukturanteilen der Thrombozyten ergeben kann.
- 3) Wenn Plasmin die Aggregation durch Kollagen verhindern kann (KOWALSKI et al. 1964, 74), dann könnte durch Inkubation mit Fibrinolytika Plasmin entstehen, da sich durch gleichzeitige Zugabe von Fibrinolytikum und Kollagen keine Aggregationshemmung ergibt.

Welche Schlüsse müssen nun aus den Ergebnissen und vorgeschlagenen Theorien für die weitere Forschung gezogen werden:

- 1) Genaue Plasmaproteinuntersuchungen müßten angestellt werden, um die Proteine zu differenzieren, die sich aktiv an der Aggregation beteiligen.
- 2) Nachzuprüfen wäre, inwieweit das Kollagenmolekül durch Fibrinolytika verändert wird.
- 3) Inwieweit verändern die Fibrinolytika die elektrophoretische Wandergeschwindigkeit der Thrombozyten.
- 4) An welche Proteinmoleküle und an welche Teile der Thrombozyten lagern sich die Fibrinolytika an.

- 5) Welchen Einfluß haben die Fibrinolytika auf die Thrombozytenfaktoren, auf den Adenosinnukleotidstoffwechsel und ihre Freisetzung.
- 6) Genaue elektronenmikroskopische Untersuchungen über einen größeren Konzentrationsbereich der Fibrinolytika, der Thrombozytenenzymveränderungen durch Nachweis mit histochemischen Methoden, sowie wäre der Einfluß einer längeren Inkubationszeit festzustellen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden 38 asymmetrische Derivate der Salicyl-, gamma-Resorcyl-, Anthranil- und Thiophen-3-carbonsäure beschrieben, die in vitro sowohl eine fibrinolytische Aktivität entwickeln, als auch die Kollagen-induzierte Aggregation menschlicher Thrombozyten konzentrationsabhängig hemmen.

Dies wird an Hand der photometrischen Registriermethode nach BORN untersucht und durch Fibrinolyseexperimente, licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen ergänzt.

Es wird eine neue Methode beschrieben, mit deren Hilfe zwischen reinen Kollagenthrombozytenaggregaten und mit Fibrinolytika vorbehandelten Thrombozytenaggregaten differenziert werden kann.

Durch diese Arbeit wurde eine neue, in der Literatur noch nicht beschriebene Serie von heterocyclischen Fibrinolytika - die Phenyl-derivate der 4-Aminothiophen-3-carbonsäure - entdeckt. Mit dieser Entdeckung dürfte der Forschungsbereich für die Entwicklung synthetischer Thrombolytika wesentlich erweitert werden.

Alle Verbindungen hemmen in einem bestimmten Konzentrationsbereich die Thrombozytenaggregation, der meistens unterhalb des fibrinolytischen Aktivitätsbereiches liegt. Die Aktivität der Verbindungen in der Fibrinolyse und deren Hemmwirkung bei der Aggregation hängt von ihren Strukturen und von ihren Substitutionen sowie der Stammverbindung ab.

Durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird der eindeutige Beweis erbracht, daß die synthetischen Fibrinolytika nicht durch eine einfache Zerstörung der Thrombozyteninnenstruktur, sondern als Enzyminhibitoren die Kollagen-induzierte Aggregation menschlicher Thrombozyten zu hemmen vermögen.

Es werden verschiedene Theorien für die Wirkungsweise über Fibrinolytika sowie Anregungen für die weitere Forschung entwickelt.

TABELLE 4

Latenzperiode (Lp)

Durchschnitt	μ	=	56,5 sec
Standard Abweichung	S.D.	=	23,1 sec
Anzahl der Experimente	n	=	163
	M	=	85, 5455
	k	=	44

Person	Datum	μ	S.D.	n	Varianz
L.	21-3-69	72,0	20,8	3	432,0
	21-3-69	39,3	9,0	3	81,3333
	1-5-69	61,3	9,5	4	89,5833
	5-5-69	60,0	9,8	4	96,0
	13-5-69	70,0	10,0	3	100,0
	8-7-69	90,0	--,-	1	--,-
	13-8-69	36,0	0,0	2	0,0
	Gesamt:	59,6	17,6	20	
M.	21-4-69	66,0	8,5	2	72,0
	22-4-69	65,3	8,6	6	74,66
	23-4-69	91,5	15,9	4	251,66
	Gesamt:	74,2	16,5	12	
T.	26-3-69	25,8	6,6	5	43,2
	26-3-69	33,0	4,2	2	18,0
	7-4-69	125,0	7,1	2	50,0
	7-4-69	96,0	--,-	1	--,-
	6-5-69	49,4	12,4	5	153,8
	9-5-69	41,0	17,1	4	292,0
	11-6-69	58,3	2,9	3	8,3
	14-7-69	48,0	7,6	6	57,6
	Gesamt:	50,4	26,9	28	
D.	11-7-69	48,7	11,0	3	121,3333
	23-7-69	70,5	33,4	4	1113,0
	Gesamt:	61,1	27,1	7	

Person	Datum	μ	S.D.	n	Varianz
O.	25-3-69	26,7	5,8	3	33,3333
	27-3-69	26,0	3,5	3	12,0
	9-4-69	105,0	63,6	2	4050,0
	17-4-69	77,5	3,5	2	12,5
	18-4-69	56,7	11,5	3	133,3333
	21-5-69	77,0	9,9	2	98,0
	23-6-69	81,0	18,8	5	355,0
	14-8-69	36,0	9,8	4	96,0
Gesamt:		58,0	30,5	26	
F.	24-3-69	31,6	7,0	5	48,8
	8-4-69	60,0	16,3	4	266,6666
	14-4-69	41,6	10,4	5	108,8
	28-4-69	66,6	13,0	5	169,8
	29-4-69	79,6	26,1	5	680,8
	5-5-69	55,5	19,5	3	380,3
	12-5-69	51,3	14,4	4	206,3
	17-6-69	69,0	18,5	4	340,6666
	10-7-69	64,8	18,4	4	336,9166
	17-7-69	56,6	10,0	5	99,8
	29-7-69	58,6	8,1	5	64,8
	30-7-69	47,0	21,3	4	452,0
	6-8-69	28,0	3,5	3	12,0
	7-8-69	22,0	2,8	2	8,0
Gesamt:		54,1	20,3	58	
A.	20-6-69	60,0	8,2	4	66,6
	17-7-69	48,7	1,2	3	1,3333
	24-7-69	50,4	15,6	5	244,8
Gesamt:		53,2	11,6	12	

TABELLE 5

Maximale Deflektion (mD)

Gesamtdurchschnitt	μ	=	341,5 sec
Standard Abweichung	S.D.	=	105,7 sec
Anzahl der Experimente	n	=	163
	M	=	61,2336
	k	=	44

Person	Datum	μ	S.D.	n	Varianz
L.	21-3-69	406,7	97,1	3	9433,6667
	21-3-69	379,7	48,1	3	2312,3333
	1-5-69	337,5	46,3	4	2175,0
	5-5-69	436,3	76,8	4	5892,2500
	13-5-69	299,7	123,2	3	15180,3333
	8-7-69	320,0	--,-	1	---,-
	13-8-69	335,5	23,3	2	544,5
Gesamt:		367,2	80,7	20	
M.	21-4-69	312,0	101,8	2	10368,0
	22-4-69	324,2	97,8	6	9560,9666
	23-4-69	322,0	70,7	4	4994,6666
	Gesamt	321,4	81,7	12	
T.	26-3-69	266,2	78,1	5	6102,2
	26-3-69	262,0	67,9	2	4608,0
	7-4-69	416,0	110,3	2	12168,0
	7-4-69	228,0	--,-	1	---,-
	6-5-69	331,2	76,3	4	5824,7
	9-5-69	303,8	89,9	4	8074,9166
	11-6-69	355,0	8,6	3	75,0
	14-7-69	422,7	162,7	6	26461,8166
	Gesamt:	335,3	110,8	28	
K.	11-7-69	348,0	113,3	3	12828,0
	23-7-69	443,5	139,4	4	12425,0
	Gesamt:	402,6	128,8	7	

Person	Datum	μ	S.D.	n	Varianz
O.	25-3-69	176,7	30,6	3	933,3333
	27-3-69	218,0	92,2	3	8508,0
	9-4-69	225,0	77,8	2	6050,0
	17-4-69	385,5	78,5	2	6160,5
	18-4-69	369,7	128,0	3	16380,3333
	21-5-69	509,0	301,2	2	90738,0
	23-6-69	364,4	63,2	5	3998,8
	14-8-69	367,5	166,4	4	27691,6666
	25-6-69	274,0	22,6	2	512,0
Gesamt:		322,0	137,9	26	
F.	24-3-69	236,4	29,5	5	869,0
	8-4-69	272,5	79,7	4	6358,3333
	14-4-69	301,6	84,7	5	7164,8
	28-4-69	420,0	90,0	5	8100,5
	29-4-69	363,4	93,7	5	8782,8
	5-5-69	337,0	86,9	3	7549,0
	12-5-69	316,3	54,7	4	2989,5833
	17-6-69	302,5	19,1	4	363,0
	10-7-69	335,0	126,1	4	15894,0
	17-7-69	378,6	160,3	5	25683,8
	29-7-69	358,0	126,4	5	15987,5
	30-7-69	359,5	53,7	4	2881,0
	6-8-69	345,3	70,0	3	4905,3333
	7-8-69	452,0	209,3	2	43808,0
Gesamt:		337,7	100,7	58	
A.	20-6-69	341,3	35,2	4	1239,5833
	17-7-69	376,0	89,9	3	8076,0
	24-7-69	362,0	107,7	5	11600,0
Gesamt:		358,6	78,9	12	

TABELLE 6

Aggregationshöhe (Ah)

Durchschnitt	μ	=	18,2 cm
Standard Abweichung	S.D.	=	2,8 cm
Anzahl der Experimente	n	=	163
	M	=	80,1447
	k	=	44

Person	Datum	μ	S.D.	n	Varianz
L.	21-3-69	15,6	1,6	3	2,68
	21-3-69	15,4	1,1	3	1,1858
	1-5-69	17,4	0,9	4	0,8566
	5-5-69	18,08	0,4	4	0,1758
	13-5-69	17,7	0,2	3	0,0233
	8-7-69	17,8	-, -	1	-, -
	13-8-69	20,7	0,8	2	0,720
	Gesamt:	17,3	1,7	20	
M.	21-4-69	19,5	0,1	2	0,005
	22-4-69	18,6	0,7	6	0,4696
	23-4-69	16,4	1,9	4	3,6866
	Gesamt:	18,0	1,6	12	
T.	26-3-69	18,2	1,9	5	3,5470
	26-3-69	17,8	0,1	2	0,02
	7-4-69	17,6	-, -	1	-, -
	7-4-69	24,1	0,8	2	0,6050
	6-5-69	16,7	1,2	5	1,4030
	9-5-69	17,8	1,4	4	1,9666
	11-6-69	19,2	0,4	3	0,1733
	14-7-69	19,2	1,5	6	2,3526
	Gesamt:	18,6	2,1	28	
K.	11-7-69	16,7	0,7	3	0,720
	23-7-69	14,8	1,5	4	2,220
	Gesamt:	15,6	1,5	7	

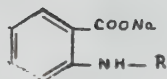
Person	Datum	μ	S. D.	n	Varianz
O.	25-3-69	14,2	0,6	3	0,3033
	27-3-69	15,0	0,2	3	0,0233
	9-4-69	13,1	4,1	2	16,820
	17-4-69	18,1	1,3	2	1,280
	18-4-69	21,1	0,6	3	0,3033
	2-5-69	20,2	1,8	2	3,380
	23-6-69	13,4	1,2	5	1,3530
	25-6-69	19,3	0,9	2	0,8450
	14-8-69	20,9	1,0	4	0,9766
Gesamt:		17,0	3,5	26	
F.	24-3-69	16,1	0,6	5	0,4120
	8-4-69	21,7	2,5	4	6,2625
	14-4-69	23,4	0,7	5	0,4600
	29-4-69	19,4	1,7	5	3,0320
	28-4-69	20,4	0,7	5	0,5350
	5-5-69	19,7	0,3	3	0,0933
	12-5-69	19,0	1,3	4	1,6800
	17-6-69	14,5	0,8	4	0,6491
	10-7-69	19,2	1,3	4	1,5666
	17-7-69	19,0	0,9	5	0,8920
	29-7-69	21,3	0,5	5	0,2580
	30-7-69	20,8	1,1	4	1,1025
	6-8-69	20,9	2,3	3	5,0833
	7-8-69	21,9	1,1	2	1,1250
Gesamt:		19,7	2,5	58	
A.	20-6-68	14,2	0,3	4	0,0900
	17-7-69	20,5	0,9	3	0,7433
	24-7-69	14,4	0,6	5	0,3830
Gesamt:		16,3	2,8	12	

TABELLE 7

Abkürzungen:

f = fibrinolytisch bei (mM)
 Q = Quelle
 g = getestet bei (mM)
 μ = Durchschnitt
 % A-H = % Aggregationshemmung
 % A = % Aggregation
 S. = Streubreite
 n = Anzahl der Experimente

ANTHRANILSÄURE



R	f	Q	g	n	% A		% A-H
					S	μ	
H	40	2	1,0	3	98,3-103,4	100,2	0
			2,0	1		85,8	14,2
			4,0	1		70,9	29,1
			6,0	1		50,8	49,2
	20	6	0,1	1	1,1- 39,6	93,8	6,2
			0,2	1		95,8	4,2
			0,5	1		69,8	30,2
			1,0	5		21,4	78,6
	10	6	0,5	1		79,2	20,8
			1,0	1		9,2	90,8
	4	6	0,5	1	6,4- 37,1	43,1	56,9
			1,0	3		16,8	83,2
	20	6	0,5	1		81,6	18,4
			1,0	1		14,8	85,2

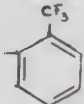
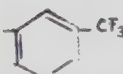
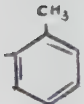
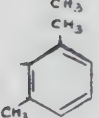
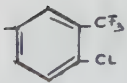
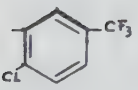
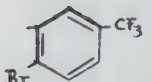
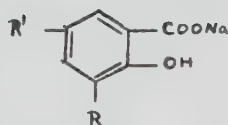
R	f	Q	g	n	% A		% A-H
					S.	p	
	5	6	0,5 1,0	1 1		31,3 25,4	68,7 74,6
	3	10	0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 1,0 2,0 4,0 5,0 10,0 15,0	4 6 4 4 8 5 4 1 1 1 1	66,3-100,5 7,6- 87,6 11,1- 58,7 11,3- 62,0 3,7- 30,4 0,0- 26,9 17,1- 48,2	79,4 41,6 35,5 27,1 20,9 10,5 27,1 16,7 13,6 (L) L	20,6 58,4 64,5 72,9 79,1 89,5 72,9 83,3 86,4
	55	6	1,0	2	59,3- 67,9	63,6	36,4
	20	6	0,5 1,0	1 1		103,0 40,1	0,0 59,9
	2	6	0,5 1,0	1 2	20,9- 37,5	22,4 29,2	77,6 70,8
	(2)	6	0,5 1,0	2 1	17,9- 33,6	25,8 21,6	74,2 78,4
	(2)	6	0,5 1,0	2 1	9,7- 17,2	13,5 15,6	86,5 84,4

TABELLE 8

Abkürzungen:

f = fibrinolytisch bei (mM)
 Q = Quelle
 g = getestet bei (mM)
 n = Anzahl der Experimente
 % A = % Aggregation
 S. = Streubreite
 μ = Durchschnitt
 % A-H = % Aggregationshemmung

SALICYLSÄURE



R	R'	f	Q	g	n	% A		% A-H
						S	μ	
H	H	(150)	2	0,1	2	92,3- 98,3	95,3	4,7
				0,2	2	105,4-107,1	106,3	0,0
				0,5	2	99,4-101,8	100,6	0,0
				1,0	1		97,0	3,0
				5,0	1		97,0	3,0
				10,0	2	39,9- 59,5	49,7	50,3
				15,0	1		17,8	82,2
				20,0	1		19,3	80,7
	H	5	9	0,1	2	106,3-108,0	107,2	0,0
				0,2	1		101,7	0,0
				0,5	1		106,3	0,0
				1,0	1		97,1	2,9
				2,0	1		92,9	8,1
				5,0	4	15,2- 49,7	33,8	66,2
				10,0	1		16,6	83,4
				15,0	1		18,4	81,6
H		3	9	0,1	1		105,8	0,0
				0,2	1		104,9	0,0
				0,5	1		102,5	0,0
				1,0	3	98,4-106,4	102,3	0,0
				2,0	2	41,8-102,5	72,2	27,8
				5,0	1		93,1	6,9
				8,0	2	9,6- 13,7	11,7	88,3
				10,0	2	3,9- 10,8	7,4	92,6
				15,0	1		2,0	98,0

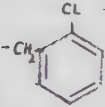
R	R'	f	Q	g	n	% A		
						S	μ	% A-H
CH_2 - 	H	2	9	0,1	3	84,0-110,1	99,0	0,0
				0,2	2	84,6-102,4	93,5	6,5
				0,3	3	33,6- 62,0	46,0	54,0
				0,4	2	20,6- 38,0	29,3	70,7
				0,5	4	17,6- 65,7	40,6	59,4
				1,0	1		20,2	79,8
				5,0	2	23,0- 34,3	28,7	71,3
				8,0	2	17,4- 23,0	20,2	79,8
				10,0	2	0,0- 14,6	7,3	92,7
				15,0	1		18,5	81,5
				20,0	1		(L)	
CH_2 -CH=CH- 	H	3	9	0,3	1		76,8	23,2
				0,5	1		86,2	13,8
				1,0	2	12,3- 29,1	20,7	79,3
				2,0	1		4,9	95,1
H	-O-CH ₂ - 	7	1,0	2		100,6-101,3	101,0	0,0
H	I	20	4	0,5	2	63,5- 92,6	78,0	22,0
I	I	2	2	0,1	1		100,0	0,0
				0,5	1		100,0	0,0
				1,0	2	95,4- 97,3	96,4	3,6
				2,0	3	87,0-100,0	96,1	3,4
				4,0	3	0,0- 33,4	14,4	85,6
CH_3 -C-CH ₃ CH ₃	CH_3 -C-CH ₃ CH ₃	(0,9)	3	2,0	1		63,8	36,2

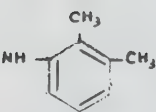
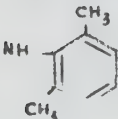
TABELLE 9

Abkürzungen:

- f = fibrinolytisch bei (mM)
 Q = Quelle
 g = getestet bei (mM)
 n = Anzahl der Experimente
 % A = % Aggregation
 S. = Streubreite
 μ = Durchschnitt
 % A-H = % Aggregationshemmung

THIOPHEN-3-CARBONSÄURE



R	f	Q	g	n	% A		% A-H
					S	μ	
H	> 500	4	0,5	1		102,1	0,0
			1,0	1		93,1	6,9
			2,0	1		79,0	21,0
			4,0	1		21,1	78,9
			6,0	1		0,0	100,0
	6	10	0,1	5	12,9- 99,0	72,5	27,5
			0,2	2	67,6- 91,8	79,7	20,3
			0,3	5	3,4- 89,9	52,4	47,6
			0,4	2	34,3- 48,8	41,5	58,5
			0,5	7	0,0- 54,6	29,5	70,5
			1,0	3	16,0- 17,1	16,6	83,4
	7	9	0,5	2	8,3- 18,5	13,4	86,6
			1,0	3	12,5- 23,7	17,4	82,6
			2,0	1		20,9	79,1
	5	9	0,1	1		98,1	0,0
			0,3	1		85,0	15,0
			0,5	6	75,1- 96,9	83,9	16,1
			1,0	8	11,6- 54,1	22,1	77,9
			2,0	1	14,2	14,2	85,8
			4,0	1		13,6	86,4
			6,0	1-		11,8	88,2

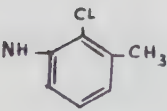
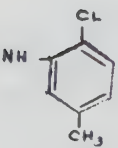
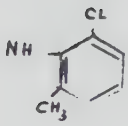
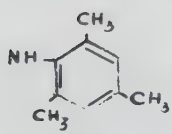
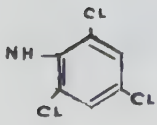
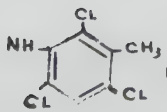
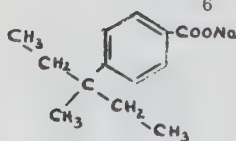
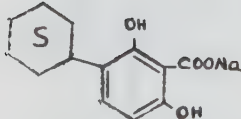
R	f	Q	g	n	% A		% A-H
					S	μ	
	3	9	0,005	1		98,6	0,0
			0,01	2	74,6- 87,6	80,1	19,9
			0,02	2	74,6- 84,9	79,9	20,1
			0,05	5	21,5- 66,7	40,1	59,9
			0,1	5	9,5- 35,7	20,9	79,1
			0,2	3	2,9- 43,3	25,6	74,4
			0,3	2	2,3- 9,4	5,8	94,2
			0,4	2	4,7- 5,6	5,2	94,8
			0,5	4	0,0- 13,2	7,5	92,5
			1,0	4	7,7- 25,5	15,6	84,4
			2,0	1		23,5	76,5
	3	9	0,5	2	102,6-113,5	108,1	0,0
			1,0	3	6,9- 50,4	23,3	76,7
			2,0	1		15,3	84,7
	4	9	0,1	4	14,9- 77,6	54,2	45,8
			0,5	4	7,9- 28,6	16,8	83,2
			1,0	3	0,0- 17,5	8,1	91,9
			2,0	1		8,5	91,5
			5,0	2	4,9- 6,7	5,8	94,2
			10,0	2	4,9- 5,5	5,2	94,8
	3	9	0,1	4	27,5-100,8	80,3	19,7
			0,2	3	77,9- 99,2	91,8	8,2
			0,3	2	93,6	93,6	6,2
			0,4	3	9,2- 92,5	45,6	54,4
			0,5	6	7,2- 98,4	32,4	67,6
			1,0	5	8,8- 90,5	35,0	65,0
			2,0	1		27,3	72,7
			5,0	1		69,9	30,1
			10,0	1		8,1	91,9
	(2)	9	0,5	2	22,9- 65,3	44,1	55,9
			1,0	2	18,0- 29,5	23,7	76,3
	(5)	9	0,5	2	11,1- 56,3	33,7	66,3
			1,0	2	11,1- 35,8	18,5	81,5

TABELLE 10

Abkürzungen:

f = fibrinolytisch bei (mM)
 Q = Quelle
 g = getestet bei (mM)
 n = Anzahl der Experimente
 % A = % Aggregation
 S. = Streubreite
 μ = Durchschnitt
 % A-H = % Aggregationshemmung

Formel	f	Q	g	% A		% A-H	n
				S	μ		
	35	2	2,0 4,0		45,0 22,0	55,0 78,0	1 1
	6	1	2,0		64,8	35,2	1
	3	9	0,1 0,2 0,5 1,0 2,0 5,0 10,0	96,2-107,8	107,7 98,3 100,2 101,1 103,8 83,8 31,9	0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 16,2 68,1	1 1 3 1 1 1 1

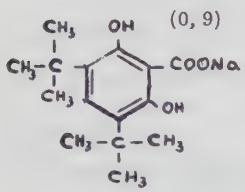
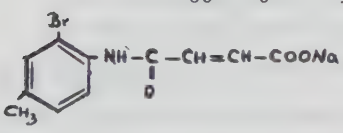
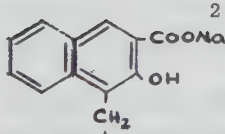
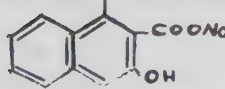
Formel	f	Q	g	% A		% A-H	n
				S	μ		
	(0, 9)	8	1, 0	20, 2- 37, 2	26, 9	73, 1	4
			2, 0		18, 3	81, 7	1
			4, 0		22, 0	78, 0	1
	30	6	1, 0	80, 0	80, 0	20, 0	2
	500	5	0, 5		110, 0	0, 0	1
			1, 0		83, 9	16, 1	1
			2, 0		100, 6	0, 0	1
			4, 0		100, 6	0, 0	1
			6, 0		99, 2	0, 0	1
	2	4	2, 0	31, 0- 42, 4	100, 6	0, 0	1
			4, 0		36, 7	63, 3	2
							

TABELLE 11

Literaturübersicht (abgeschlossen am 15. September 1969) über die Herstellungsarten des Thrombozyten-reichen-Plasmas, des Kollagens, der angewandten Aggregationsmeßmethoden, sowie der bei der Kollagen-induzierten Aggregation getesteten Verbindungen.

Bei unvollständigen Angaben beruht dies auf den Hinweisen der einzelnen Autoren.

DIDISHEIM (1969, 28)

Dipyridamol (Persantin) verhinderte fast vollständig thrombotische Abdichtung in einem Teflon Mikroschunt

DOERY et al. (1969, 29)

(siehe dazu auch EVANS et al. 1968, 37; WEISS et al. 1968, 156)

Verbindungen:

Aspirin: Endkonzentration 55,5 mM
totale Aggregationshemmung
Endkonzentration 1,0 mM
teilweise Hemmung bei weniger aktivem Kollagen

Thrombozytenherstellung:

Herstellung nach Loder et al. (1968, 81)

Menschliches Zitratblut wurde bei 200 g und 4°C zentrifugiert.

Suspension gewaschener Thrombozyten:

nach der Methode von DOERY et al. (1969, 30)

1 bis 2×10^6 /cmm menschlicher Thrombozyten wurden in modifizierter Ringer-Lösung suspendiert.

Kollagenherstellung:

Lyophilisiertes Kollagen (Sigma, USA) - 10 mg/ml Lösung - wurde in Tyrode-Lösung durch Ultraschalldisintegration bei 4°C in kurzen Abständen über die Zeitspanne einer Stunde disintegriert. Der opaque Überstand wurde als Agens verwandt.

Methode der Aggregationsmessung:

mit der photometrischen Methode und nach LODER et al. (1968, 81)

HASLAM (1967, 51)

Verbindungen:

Bei der Vorinkubierung von 0,2 mM Phosphoenolpyruvat und 2,5 Einheiten/ml Pyruvatkinase für 5 Minuten bei 37°C ergibt sich eine Verhinderung der maximalen Kollagen-induzierten Aggregation, eine teilweise Desaggregation sowie eine Verlängerung der Latenzperiode.

Testansatz:

0,05 ml Gift-ADPase (Aktivität 0,1 μ M/min.) in 0,1 M Tris-phosphat-Puffer (pH = 8,0) mit 1 mM Cystein ergibt sich hier eine vollkommene Aggregationshemmung.

Thrombozytenherstellung:

Frisches Blut wurde in 5 Einheiten/ml Heparin aufgefangen, bei 250 g für 15 Minuten bei Zimmertemperatur zentrifugiert, und das TRP bei Zimmertemperatur aufgehoben.

Kollagenherstellung:

Homogenisierung von Kollagen (Sigma Chem. Comp.) in NaCl-Lösung bei 0°C; große Teilchen wurden durch Zentrifugation beseitigt.

Methode:

Experimente wurden bei 37,5°C durchgeführt. Gemessen wurde die Extinktionsabnahme gegen Wasser mit einem Evans Gelbfilter Nr. 606.

HOVIG (1965, 59)

Verbindungen:

Die Substanzen wurden an gewaschenen Plättchen getestet; resuspendiert in zitriertem Thrombozyten-armen-Plasma:

Kontrolle		++
Trypsin	0,03 mg/ml	+
	1,00 mg/ml	+
Papain	1,00 mg/ml	+
Phospho-lipase	50,00 ug/ml	+

+ = keine Aggregation innerhalb von 3 Minuten

++ = sichtbare Aggregation

Enzyme wurden mit dem TRP vorinkubiert.

Thrombozytenherstellung:

Nach der Methode von HOVIG (1963, 58)

Thrombozyten-armes-Plasma: TRP, 10 000 g, 10 Minuten, 4°C.

Kollagenherstellung:

Nach der Methode von HOVIG (1963, 58)

Methode der Aggregationsmessung:

Nach der Methode von ADA et al. (1961, 1)

HOVIG, HOLMSEN (1963, 60)

Verbindungen:

AMP (Adenosin-mono-phosphat) hemmt die Aggregation durch Seenextraktsuspension.

Thrombozytenherstellung:

Hasenthrombozyten wurden nach der Methode von HOVIG (1963, 58) bereitet.

Kollagenherstellung:

Nach der Methode von HOVIG (1963, 58)

Methode der Aggregationsmessung:

Aggregation wurde durch Schütteln mit der Hand herbeigeführt bei

Zimmertemperatur; nach 3 Minuten wurde die maximale Aggregation abgelesen. Testansatz: 2 ml Extrakt + 5 ml Zitrat-TRP.

HOVIG et al. (1968, 61)

Verbindungen:

Wird Kollagen durch Fibrin bedeckt, wird dadurch die Kollagen-induzierte Aggregation in vitro verhindert.

Thrombozytenherstellung:

Quelle: Schwein, Hase

Blut wurde aufgefangen in silikonisierten Glaszentrifugationsreagenzgläsern, die mit 3,8 % Trinatriumzitrat oder 1,5 % EDTA gefüllt waren. Mischungsverhältnis 1:9; Zentrifugation: 77 g, 10 Minuten, bei 4°C.

Kollagenherstellung:

Entweder von Schwein, Hase oder Handelskollagen (Sigma Chem. Comp.) nach der Methode von HOVIC (1963, 58)

Methode der Aggregationsmessung:

Nach der Methode von MUSTARD et al. (1964, 96)

Experimentdauer: 5 - 15 Minuten bei 37°C. Turbidimetrische Methode.

JERUSHALMY, ZUCKER (1966, 68)

Verbindungen:

36 - 38 kaseinolytische Einheiten von Plasmin wurden gereinigtem Fibrinogen bei 25°C, pH 8,5 zugesetzt.

5	+	120	Minuten FAP leichte Hemmung
10	+	60, 30, 15	Minuten FAP 50 % Hemmung
1320			Minuten FAP keine Hemmung

(FAP = Fibrinogenabbauprodukte)

Thrombozytenherstellung:

Menschliches Blut wurde in Plastikbeuteln aufgefangen, die ACD (Formel A) enthalten, Mischungsverhältnis 1:7, langsame Zentrifu-

gation bei 4°C.

Kollagenherstellung:

Subkutanes Fett wurde nach der Methode von SPAET, ZUCKER (1964, 140) aufbereitet, jedoch nur zweimal gewaschen. Jedes Gramm Fett ergab 0,5 ml Endsuspension.

Methode der Aggregationsmessung:

Graduierung der Aggregation von 0 - 4+ nach 3 Minuten langem Schütteln.

Testansatz: 1 ml FAP + 3 ml TRP

KOPEC et al. (1967, 73)

Verbindungen:

- a) frühe Fibrinogenabbauprodukte
- b) späte Fibrinogenabbauprodukte

Beide wurden in der Endkonzentration von 0,45 % in der Kollagen-induzierten Aggregation untersucht, wobei a) die Aggregation stärker als b) hemmt. Thrombozytensuspension wurde mit Streptokinase aktiviertem Plasminogen (Herstellung nach KOWALSKI et al. 1964, 71) versetzt. 0,25 Volumeneinheiten des aggregierenden Agens wurden dazugegeben und die Aggregation nach 3 Minuten langem Schütteln mit der Hand beobachtet.

Ergebnis: unverdaut: ++++
verdaut : +

Thrombozytenherstellung:

keine Angaben

Kollagenherstellung:

Verdünnte Bindegewebssuspension vom Ligamentum nuchae des Rindes.

Methode der Aggregationsmessung:

Optische Dichteveränderung wurde während dem automatischen Rühren in Intervallen von 30 Sekunden gemessen.

LEGRAND et al. (1967, 79)⁺

Verbindungen:

D-Glucosamin 4 mg:

zugegeben zum Kollagen während der Vorinkubierung; es ergibt sich vollkommene Hemmung. Diese Konzentration korrespondiert mit 440 μM von Glucosamin/mg Kollagen oder mit 150 μM von Glucosamin / 10^9 Thrombozyten.

D-Glucosamin 2 mg:

zugegeben zum Kollagen während der Vorinkubierung; es ergibt sich eine 27 % Aggregationshemmung.

Thrombozytenherstellung:

Verwandt wurde menschliches Zitratblut; TRP wurde durch Differenzialzentrifugation bei 4°C nach der Methode von SINAKOS, CAEN (1966, 131) hergestellt.

Testansatz:

Inkubation bei 33°C; je länger die Vorinkubation, desto stärker wurde die Aggregationshemmung.

40 μg Kollagenfäden in Suspension

3, 6 mg D-Glucosamin (entspricht 20 μM)

15×10^7 Thrombozyten (entspricht $2,5 \times 10^5$ /cmm Thrombozyten)

Gesamtvolumen: 0,8 cc (0,6 cc TRP + 0,2 cc Kollagensuspension)

Kollagenherstellung:

Lösliche Kollagensuspension von Kalb-Haut oder embryonaler Kalb-Haut wurde nach der Methode von LAPIERE (1965, 78) hergestellt.

Methode der Aggregationsmessung:

Durchlässigkeit der Lichtintensität als Funktion der Zeit bei einer Lichtwellenlänge von 600 m μ nach der Methode von BORN, CROSS (1963, 14)

⁺ siehe dazu auch HUGUES (1968, 63)

MASON, SABA (1969, 87)

Verbindungen:

getestet in gewaschenen Thrombozyten

	<u>Endkonz.</u>	<u>Graduierung</u>
p-chlormercuribenzoessäure	10 ⁻⁴	neg.
	10 ⁻⁶	1+
p-chlormercuribenzensulfonsäure	10 ⁻⁴	neg.
	10 ⁻⁶	neg.
p-hydroxymercuribenzoat	10 ⁻⁴	neg.
	10 ⁻⁶	2+
Salyrgan	10 ⁻⁴	neg.
	10 ⁻⁶	1+
N-äthylmaleimid	10 ⁻⁴	2+
	10 ⁻⁶	2+
5, 5' -dithiobis-2-nitrobenzoessäure	10 ⁻⁴	1+
	10 ⁻⁶	1+
Dinitrophenol	10 ⁻⁴	2+
	10 ⁻⁶	1+

1+ = 5 Thrombozyten/Aggregat

4+ = über 100 Thrombozyten/Aggregat

Thrombozytenherstellung:

Blut wurde in 0,11 M Trinatriumzitrat im Verhältnis 1:8 aufgefangen, 8 Minuten bei 100 g und Zimmertemperatur zentrifugiert. Für die Methode des Waschens der Thrombozyten siehe MASON, SABA (1969, 87).

Kollagenherstellung:

Verwandt wurde menschliche Achillessehne und die Suspension wurde nach der Methode von HOVIG, HOLMSEN (1963, 60) hergestellt.

Methode der Aggregationsmessung:

Makroskopische Thrombozytenaggregationsbeobachtung nach der Methode von BRINKHOUSE et al. (1958, 19)

MILLS, ROBERTS (1967, 89)⁺)

Verbindungen:

Aktivsten Verbindungen (Endkonzentration 10 μM /L und größer)

Nortriptylin

Amitriptylin

weniger aktive Verbindungen (Endkonzentrationen 10 μM /L und größer)

Chlorpromazin

Promethazin

Benadryl

Imipramin

Diphenphyramin

Beide Gruppen verlängern die Latenzperiode und vermindern die Kollagen-induzierte Aggregation.

Thrombozytenherstellung:

Menschliches Blut wurde in Plastikzentrifugationsreagenzgläsern aufgefangen, die mit 3, 8 % Zitrat im Verhältnis 1:9 gefüllt waren. Anschließend Zentrifugation bei 226 g für 10 Minuten bei Zimmertemperatur. Das TRP wurde bei Zimmertemperatur aufgehoben. Das Gesamtvolumen für die Experimente ist 1 ml, das bei 37°C für 5 Minuten vorinkubiert wurde.

Kollagenherstellung:

Kollagensuspension wurde jeden Tag neu hergestellt. Es wurde trockenes Kollagen (Sigma London Ltd.) in NaCl-Lösung zerrieben und dann zentrifugiert, um die großen Teilchen zu entfernen.

Methode:

Turbiditätsmethode nach BORN (1962, 11)

NISHIZAWA et al. (1969, 104)⁺⁺)

Verbindungen:

Phosphatidylserin-reiche Fraktion vom Rinderhirn wurde durch Infusion in Schweine gegeben. Dadurch ergab sich eine Hemmung der

⁺) siehe auch dazu HUGUES (1968, 63)

⁺⁺) siehe dazu auch: MUSTARD et al. (1967, 97)

Kollagen-induzierten Aggregation im Thrombozyten-reichen-Zitratplasma. Wurde das Blut in einer Suspension von Phosphatidylserin-reicher Fraktion vor der Zugabe des Antikoagulans aufgefangen, ergab sich eine Aggregationshemmung bei einer Konzentration von 50 µg/PS/ml Blut.

Thrombozytenherstellung:

Blut des Schweines wurde in silikonisierten Glasreagenzgläsern in 3,8 % Natriumzitrat im Verhältnis 1:9 aufgefangen. Anschließend Zentrifugation bei 77 g, 10 Minuten bei Zimmertemperatur.

Kollagenherstellung:

Aus Schweinesehne oder Handelskollagen (Sigma, Chem. Comp.) wurde nach der Methode von HOVIG (1963, 58) die Suspension hergestellt. Kollagen wurde homogenisiert und suspendiert in modifizierter Tyrode-Lösung, zentrifugiert bei 810 g für 15 Minuten, um die größeren Teilchen zu entfernen. Der Überstand wurde mit Tyrode-Lösung verdünnt, bis zu der Konzentration, die maximale Aggregation induzieren konnte.

Methode der Aggregationsmessung:

Aggregation nach der Methode von MUSTARD et al. (1964, 96) ausgeführt bei 37°C, Thrombozytenzahl wurde in allen Testreagenzgläsern gleich eingestellt.

NOSSEL (1969, 106)[†])

Verbindungen:

Kollagenaggregation kann verhindert werden durch:

- a) Verlust der Helixstruktur des Kollagens
- b) Behandlung mit DNFB, N-azetylation und Stickstoffsäure des Kollagenmoleküls
- c) Succinylation des Kollagens (NH_2^+ ist ersetzt durch $\text{COCH}_2\text{CH}_3\text{COCH}_3$)

[†]) siehe dazu auch WILNER et al. (1968, 158); GUSTAVSON (1961, 44)

O' BRIEN (1969, 107)

<u>Verbindungen</u>	<u>Endkonzentration</u>		
	<u>5×10^{-4} M</u>	<u>5×10^{-5} M</u>	<u>5×10^{-6} M</u>
Meclofenamsäure	4	4	3
Aspirin	4	4	2
Indocid	4	4	-
Ibuprofen	4	1/2	-
Ponstan	4	1/2	-
Pyramidon	4	1/2	-
Doloxen	4	1/2	-
Paracetamol	4	1/2	-
Butazolidin	4	1/2	-
Tanderil	0	0	-
Phenacetin	0	0	-
Gentissäure	0	0	-
Codein	0	0	-
Dihydrocodein	0	0	-
Natriumsalicylsäure	0	0	-

Thrombozytenherstellung:

Menschliches Zitratblut und daraus Herstellung von thrombozytenreichem-Plasma

Testansatz:

TRP wurde mit Verbindungen für genau 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Kollagenherstellung:

nach O' BRIEN et al. (1966, 109)

Methode der Aggregationsmessung:

Graduierung von 4 als grobe Hemmung und 0 für die Kontrollaggregation; - : nicht getestet.

O' BRIEN et al. (1969, 111)

Verbindungen:

Heparin in der Endkonzentration von 104 Einheiten/ml verhindert stark die Kollagen-induzierte Aggregation.

Thrombozytenherstellung:

Menschliches Blut wurde in verschiedenen Konzentrationen von Heparin und Zitrat aufgefangen.

Kollagenherstellung:

Trockenes Kollagen (Sigma Comp.) wurde mit der Hand in NaCl-Lösung aufgerieben, große Teilchen wurden abzentrifugiert und die Konzentration zu einer moderaten Aggregationskraft verdünnt.

Methode der Aggregationsmessung:

Nach der Turbidimetrischen Methode von O' BRIEN et al. (1966, 109). Gemessen wurde der Anstieg der Aggregationskurve. Ausführung der Experimente bei 37°C.

PACKHAM et al. (1967, 114)

Verbindungen:

Butazolidin und Anturan in vivo und vitro.

Infusion von 25 mg/kg (Hase) unterdrückte nach der Infusion im Zitratplasma die Kollagen-induzierte Aggregation. Infusion von 150 mg/kg (Hase) von Anturan unterdrückte die Kollagen-induzierte Aggregation stark. (ADP- und Thrombin-induzierte Aggregation wurde davon nicht beeinflußt). Aggregationshemmung wurde bei 10 mg/ml Butazolidin und 1 mg/ml Anturan im Menschen, Hasen und Schwein mit Thrombozyten-reichem-Plasma sowie bei gewaschenen Thrombozyten gefunden.

Thrombozytenherstellung:

3, 8 % Trinatriumzitrat im Verhältnis 1:9; Zentrifugation bei 77 g, für 15 Minuten und bei Zimmertemperatur. Überstehendes TRP wurde mit silikonisierten Pasteur-Pipetten abgehoben.

TRP-Suspension vom Schwein in 2 % EDTA-NaCl-Lösung (1:9)

a) zentrifugiert wie oben oder

b) für 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann bei

650 g, für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Leicht resuspendiert, 2 mal in kalter Tyrode-Albumin-EDTA-Lösung gewaschen und am Schluß wurden sie in Tyrodegelatin-Lösung resuspendiert. Es wurde eine Plättchenkonzentration von 500 - 600 000/cmm angestrebt. Die Thrombozyten wurden dann in einem Eisbad aufgehoben.

Kollagenherstellung:

2 g Kollagen (Sigma Chem. Comp.) suspendiert in 100 ml Tyrode-Lösung und mit einem Waring Homogenisierer für 5 Minuten lang gerieben. Ein Erhitzen wurde vermieden. Diese Mixtur wurde dann bei 810 g, für 15 Minuten lang zentrifugiert, um die großen Teilchen zu entfernen. Der Überstand wurde in Tyrode-Lösung verdünnt, um eine Konzentration zu erreichen, die maximale Aggregation ergab. Bei weiteren Verdünnungen wurde dieser Effekt abgeschwächt.

Methode der Aggregationsmessung:

Turbititätsmethode nach MUSTARD et al. (1964, 96)

SOLUM (1968, 136)

Verbindungen:

- a) Adenosin (ca. 0,13 mM) hemmt die Kollagen-induzierte Aggregation. Vorinkubierung bei 20°C, 7 Minuten.
- b) Kollagensuspension verliert die Aggregationsinduktionsfähigkeit, wenn sie bei 105 000 g, 30 Minuten lang in Tris-gepufferter NaCl-Lösung, pH 7,4 ultrazentrifugiert wird.

Thrombozytenherstellung:

Nach der Methode von SOLUM, STORMORKEN (1965, 137)

Kollagenherstellung:

Verwandt wurde Handelssehnenkollagen (Sigma Chem. Comp.). 1,6 g Kollagen wurde in 115 ml Tris-gepufferter NaCl-Lösung 5 mal für 1 Minute mit dazwischenliegendem Kühlen homogenisiert.

Methode der Aggregationsmessung:

Nach der Turbidimetrischen Methode von BORN (1962, 11)

Verwandt wurde ein Evans Filter Nr. 605 und gerührt wurde für 25 sec bei 20°C.

SPAET et al. (1962, 138)

Verbindungen:

Polybren (Molekulargewicht: 2800) hemmt die Aggregation. Trypsinierte Thrombozyten können nicht mit Kollagen aggregiert werden.

Thrombozytenherstellung:

Menschliches Blut wurde in silikonisierten Behältern aufgefangen in 3,8 % Natriumzitrat im Verhältnis 1:9, Zentrifugation: 600 UpM 15 Minuten lang.

Kollagenherstellung:

Kollagensuspension wurde aus menschlichem subkutanen Fettgewebe von der vorderen Abdominalwand nach der Methode von SOLUM (1968, 136) hergestellt. Die Methode wurde modifiziert. Kollagen wurde gefroren bis zum Gebrauch.

Fett wurde in kleine Stückchen zerschnitten, homogenisiert für ca. 5 Minuten mit 5 Volumeneinheiten isotonischer NaCl-Lösung, zentrifugiert für 30 Minuten bei 3000 UpM in einer Internationalen Klinischen Zentrifuge. Mittelsuspension wurde verdünnt bis auf die zweifache effektive Konzentration, die für die maximale Aggregation benötigt wurde.

Methode der Aggregationsmessung:

Semiquantitativ mit einem Beckman DB-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 610 mμ gegen thrombozyten-armes-Plasma, anschließend für 10 Minuten bei Zimmertemperatur mit der Hand geschüttelt und anschließend die zweite Ablesung.

Testansatz: 1 ml von jedem: TRP, Aggregationsagens, Testhemmer.

THOMAS (1968, 145)⁺⁾

Verbindungen:

Phentolamin

Dihydroergotamin beide 1 - 3 μ M, 1 Minute, 37°C vorinkubiert
verhindert die Aggregation.

Tyramin (0,1 - 2,0 mM) mit Vorinkubierung von 10-20 Minuten bei 37°C konnte ein Aggregationshemmeffekt gezeigt werden.

Thrombozytenherstellung:

Menschliches Blut wurde in Plastikreageznzgläsern in 3,8 % Trina-triumzitrat im Verhältnis 1:9 aufgefangen. Zentrifugation: 226 g, 10 Minuten bei Zimmertemperatur. TRP wurde bei Zimmertemperatur aufgehoben und innerhalb 3 Stunden nach der Blutentnahme verwandt.

Kollagenherstellung:

Verwandt wurde Sehnenkollagen (Sigma Chem. Comp.), das in 0,154 M NaCl-Lösung aufgelöst wurde. Die frische Suspension wurde für jedes Experiment neu hergestellt.

Methode der Aggregationsmessung:

Nach der Turbidimetrischen Methode nach BORN (1962, 11) 1 ml TRP wurde für 5 Minuten bei 37°C in silikonisierten Glasreagenzgläsern inkubiert und dann in die Maschine überführt.

⁺⁾ siehe dazu auch: MANNUCCI, SIRIGU (1969, 84)

ZUCKER, BORRELLI (1962, 164)⁺⁾

Verbindungen:

Die NaCl-Extrakte aus folgenden Organen des Menschen erbrachten keine Aggregation oder nur lose Aggregate in einer Verdünnung 1:10:

Milz, Leber, Niere, Pankreas, Ileum, Jejunum;

Hirn und Lunge waren in der Verdünnung 1:10 nicht

aber ohne Verdünnung aktiv in der Hemmung.

Kollagenase verhinderte die Thrombozytenaggregation von NaCl-Sus-

pension von subkutanem Fett (Mensch) oder Mausschwanzsehne in Gegenwart von 0,001 M CaCl_2 .

NaCl-Extrakt aus der Mausleber gemischt mit einer Suspension von Rattenhaut, Schwanzsehnen, Bindegewebe, verdünnter Suspension von menschlichem Bindegewebe oder gereinigtem Kollagen (2 Minuten Präinkubation bei Zimmertemperatur) verhinderte die Aggregationsfähigkeit dieser Suspension. Der Betrag für die vollkommene Hemmung der Aggregation durch Leberextrakt ist abhängig von der Potenz der Bindegewebspräparation. Hemmung wurde auch herbeigeführt durch HgCl_2 in einer Konzentration von 10^{-3} M.

Thrombozytenherstellung:

Menschliches Blut wurde in 0,11 M Natriumzitrat im Verhältnis 1:9 aufgefangen. TRP wurde durch langsame Zentrifugation erhalten und wurde bei Zimmertemperatur aufgehoben.

Kollagenherstellung:

200 mg Gewebe wurde in 3 ml 0,9 % NaCl-Lösung mit der Hand homogenisiert, anschließend für 5 Minuten bei 2500 UpM (Internationale Klinische Zentrifuge) zentrifugiert. Das Sediment und überstehendes Fett wurde verworfen. Menschliches subkutanes Fett wurde durch radikale Mastektomie erhalten, das dann frei von Blut und Brustgewebe gemacht wurde. Dies wurde dann bei -20°C aufgehoben.

Methode der Aggregationsmessung:

Reagenzgläser wurden mit der Hand gleichmäßig geschüttelt bei Zimmertemperatur und jede Minute makroskopisch genau beobachtet für 3 Minuten. Anschließend wurde es im Phasenkontrastmikroskop untersucht.

⁺) siehe hierzu auch: PUSZKIN, JERUSHALMY (1968, 118)

WILNER et al. (1968, 158)

ZUCKER, JERUSHALMY (1967, 165)

<u>Verbindungen oder Zustand</u>	<u>Endkonzentration</u>	<u>Graduierung</u>
Kontrolle	--	4+
Tris-Puffer	--	4+
Adenosinmonophosphat	1,25 mM	3+
Adenosin	2,50 mM	3+
EDTA	2,00 mM	1+
Arcain	1,25 mM	1+
Heparin	2 Einh./ml	4+
Früh-Fibrinogenabbauprodukt	0,65 g%	2+
Spät - " " "	0,65 g%	2+
NaF	2,00 mM	4+
NaCN	2,00 mM	4+
Jodazetatnatrium	1,00 mM	4+
NaCN + Jodazetatnatrium	2+1,0 mM	1+
N-äthylmaleimid ^{†)}	0,25 mM	2+
N-äthylmaleimid	1,25 mM	1+
Benadryl	1,14 mM	3+
45°C 15 Min. TRP	-, --	1+
45°C 60 Min. TRP	-, --	1+
thrombasthenische Thrombozyten		0

Thrombozytenherstellung:

nach JERUSHALMY, ZUCKER (1966, 68)

verwandt wurden: gesundes, menschliches Blut, aufgefangen in Plastikbeuteln mit ACD-Lösung, 0,11 M Natriumziträt (Verhältnis 1:9) oder 2 Einheiten/ml Heparin.

Bindegewebslösungsherstellung:

nach JERUSHALMY, ZUCKER (1966, 68)

Subkutanen Fett aufgelöst in isotonischer, gepufferter NaCl-Lösung; Lösung wurde zentrifugiert; allgemeine Größe der Teilchen ist kleiner als 1 µ im Durchmesser.

Methode der Aggregationsmessung:

Graduierung der Aggregation von 4+ für die Kontrolle bis 0+ für die größte Hemmung.

^{†)} siehe dazu auch: HARRISON et al. (1966, 47)

ZUCKER, PETERSON (1968, 166)

Verbindungen:

Aspirin Einnahme 650 mg oral:

Kontrollaggregation vor der Einnahme:

optische Dichteänderung: 0,345

Aggregation nach der Einnahme:

optische Dichteänderung: 0,085

(eigene Berechnung: 75,4 % Aggregationshemmung)

Thrombozytenherstellung:

Das venöse, menschliche Zitratblut wurde durch die zwei Spritzenmethode gewonnen und in 0,38 % Natriumzitrat ungerinnbar gemacht. Zentrifugation: 160 g, für 10 Minuten. Aufbewahrt wurde das TRP bei 37°C. Bei dieser Temperatur wurden auch die Experimente durchgeführt.

Testansatz:

11:30, vormittags	1. Probeentnahme
12:30	650 mg Aspirin, oral
1:30	650 mg Aspirin, oral
2:30	2. Probeentnahme

Kollagenherstellung:

Methode nach SKOZA et al. (1967, 133)

Methode der Aggregationsmessung:

Gemessen durch die Veränderung der optischen Dichte ohne Filter mit einem Evans Titrator nach der Methode von SKOZA et al. (1967, 133)

G. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADA G.L., FRENCH E.L., LIND P.E.
Purification and properties of neuraminidase from vibrio
cholerae.
J.gen. Microbiol. 24/3, 409-421, 1961
2. ALBRECHTSEN O.K.
The fibrinolytic activity of human tissues.
Brit. J. Haemat. 3/3, 284-291, 1957
3. AMBRUS C.M., MARKUS G.
Plasmin-antiplasmin complex as a reservoir of fibrinolytic
enzymes.
Amer. J. Physiol. 199/3, 491-494, 1960
4. AOKI N., von KAULLA K.N.
Separation of human antiactivator from antiplasmin.
Fed. Proc. 28, 441, 1969
5. AOKI N., von KAULLA K.N.
Beta-1-C-globulin and synthetic fibrinolytic agents.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130/1, 101-106, 1969
6. AOKI N., von KAULLA K.N.
Inactivation of human serum antiactivator by synthetic fibrino-
lysis inducers.
Thromb. Diath. Haemorrh. 22, 251-262, 1970
7. ASTRUP T., STERNDOFF I.
A fibrinolytic system in human milk.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84/3, 605-608, 1953
8. BETTEX-GALLAND M., LÜSCHER E.F.
Extraction of an actomyosin-like protein from human thrombo-
cytes.
Nature 184, 276-277, 1959
9. BIZZOZERO J.
Über einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle
bei der Thrombose und der Blutgerinnung.
Virch. Arch. f. pathol. Anat. 90/2, 261-332, 1882
10. BOOYSE F.M., RAFELSON M.E.
Studies on human platelets. III. A contractile protein model
for platelet aggregation.
Blood 33/1, 100-103, 1969

11. BORN G.V.R.
Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.
Nature 194, 927-929, 1962
12. BORN G.V.R.
Uptake of adenosine and adenosine diphosphate by human blood platelets.
Nature 206, 1121-1122, 1965
13. BORN G.V.R.
Mechanism of platelet aggregation and of its inhibition by adenosine derivatives.
Fed.Proc. 26, 115-117, 1967
14. BORN G.V.R., CROSS M.J.
The aggregation of blood platelets.
J.Physiol. 168, 178-195, 1963
15. BORN G.V.R., CROSS M.J.
Effects of inorganic ions and of plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate.
J.Physiol. 170, 397-414, 1964
16. BOUNAMEAUX Y.
L'accolement des plaquettes aux fibres sous-endothéliales.
C.R.Soc.Biol. 153, 865-867, 1959
17. BRECHER G., CRONKITE E.P.
Morphology and enumeration of human blood platelets.
J.Appl.Physiol. 3/6, 365-377, 1950
18. BREDDIN K.
Die Thrombozytenfunktion bei hämorrhagischen Diathesen, Thrombosen und Gefäßerkrankheiten.
Thromb.Diath.Haemorrh.Suppl. 27, 1968
19. BRINKHOUSE K.M., LeROY E.C., CORNELL W.R., BROWN R.C., HAZLEHURST J.L., VENNART G.P.
Macroscopic studies of platelet agglutination; nature of thrombocyte agglutinating activity of plasma.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 98/2, 379-383, 1958
20. CASTALDI P.A., CAEN J.
Platelet fibrinogen
J.Clin.Path. 18, 579-85, 1965

21. CASTALDI P.A., LARRIEU M.J., CAEN J.
Availability of platelet factor 3 and activation of factor XII in thrombasthenia.
Nature 207, 422-424, 1965
22. CLAUS G., EBNER H.
Grundlagen der Statistik für Psychologen, Pädagogen und Soziologen.
Volk und Wissen Volkseigener Verlag, Berlin, 1967
23. CRONBERG S.
Effect of fibrinolysis on adhesion and aggregation of human platelets.
Thromb. Diath. Haemorrh. 19, 474-482, 1968
24. CROSS M.J.
Effect of fibrinogen on the aggregation of platelet, by adenosine diphosphate.
Thromb. Diath. Haemorrh. 12, 524-527, 1964
25. DAVEY M.G., LÜSCHER E.F.
Biochemical aspects of platelet function and hemostasis.
Sem. in Haematol. 5/1, 5-17, 1968
26. DEETJEN
Untersuchungen über die Blutplättchen.
Virch. Arch. f. pathol. Anat. 164/2, 239-263, 1901
27. DEKHUYZEN M.C.
Über die Thrombozyten (Blutplättchen)
Anat. Anz. 19, 529-540, 1901
28. DIDISHEIM P.
Microscopically typical thrombi and hemostatic plugs in teflon arteriovenous shunts. S. 64-71
in: Johnson S.A., Guest M.M. (Hrsg.): Dynamics of Thrombusformation and dissolution.
L.B. Lippincott Comp.; Philadelphia u. Toronto, 1969
29. DOERY J.C.G., HIRSH J., DeGRUCHY G.C.
Aspirin: Its effect on platelet glycolysis and release of adenosine diphosphate.
Science 165, 65-67, 1969
30. DOERY J.C.G., HIRSH J., DeGRUCHY G.C.
Erythrocyte and platelet glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal and mutant Caucasians.
Scand. J. Haematol. 6/1, 5-9, 1969

31. DOMINICI H.
"Sur l'histologie de la rate au cours des états infectieux"
Arch. Med. Exper. d'anat. Path. 12, 733-768, 1900
32. DONNE A.
De l'origine des globules du sang, de leur mode de formation
et de leur fin.
C. R. Acad. Sci. 14, 366-368, 1842
33. DUGUID J. B.
Thrombosis as a factor in the pathogenesis of aortic
atherosclerosis.
J. Path. Bact. 60/1, 57-61, 1948
34. EBERTH J. C., SCHIMMELBUSCH C.
Die Blutplättchen und die Blutgerinnung.
Virch. Arch. f. pathol. Anat. 101/2, 201-244, 1885
35. EBERTH J. C., SCHIMMELBUSCH C.
Experimentelle Untersuchungen über Thrombose.
Virch. Arch. f. pathol. Anat. 103/1, 39-87, 1886
36. EBERTH J. C., SCHIMMELBUSCH C.
Über die Zusammensetzung des Thrombus.
Fortschr. d. Medizin 5/15, 467-473, 1887
37. EVANS G., PACKHAM M. A., NISHIZAWA E. E., MUSTARD J. F.,
MURPHY E. A.
The effect of acetylsalicylic acid on platelet function.
J. exptl. Med. 128/5, 877-894, 1968
38. FRENCH J. E., POOLE J. C. F.
Electron microscopy of the platelets in artificial thrombi.
Proc. Roy. Soc. Biol. 157, 170-176, 1963
39. GAARDER A., JONSEN J., LALAND S., HELLEM A. J.,
OWEN P. A.
Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiv-
ness of human blood platelets.
Nature 192, 531-532, 1961
40. GAARDER A., LALAND S.
Hypothesis for the aggregation of platelets by nucleotides.
Nature 202, 909-910, 1964
41. GOLDMAN P.
The carbon-fluorine bond in compounds of biological interest.
Science 164, 1123-1130, 1969

42. GRETTE K.
Studies on the mechanism of thrombin-catalysed hemostatic reaction in blood platelets.
Acta Physiol. Scand. 56, Suppl. 195, 1962
43. GUNNING A. J., PICKERING G. W., ROBB' SMITH A. H. T.,
RUSSEL R. R.
Mural thrombosis of the internal carotid artery and subsequent embolism.
Quart. J. Med. 33, 155-195, 1964
44. GUSTAVSON K. H.
Some reactions of succinylated collagen.
Arkiv för Kemi 17/55, 541-550, 1961
45. HAMPTON J. R., MITCHELL J. R. A.
A transferable factor causing abnormal platelet behaviour in vascular disease.
Lancet 2, 764-768, 1966
46. HANSCH C., von KAULLA K. N.
Fibrinolytic congeners of benzoic and salicylic acid
A mathematical analysis of correlation between structure and activity.
Biochem. Pharmacol. (im Druck)
47. HARRISON M. J. G., EMMONS P. R., MITCHELL R. J. A.
The effect of sulphhydryl and enzyme inhibitors on platelet aggregation in vitro.
Thromb. Diath. Haemorrh. 16, 122-133, 1966
48. HARRISON M. J. G., EMMONS P. R., MITCHELL J. R. A.
The variability of human platelet aggregation.
J. Atheroscler. Res. 7, 197-205, 1967
49. HARTLY H. O.
Testing the homogeneity of a set of variances.
Biometrika 31, 249-255, 1940
50. HASLAM R. J.
Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human blood-platelets by thrombin and by fatty acids.
Nature 202, 765-768, 1964
51. HASLAM R. J.
Mechanism of blood platelet aggregation. S. 88-112; in: Johnson S. A., Seegers W. H. (Hrsg.): *Physiology of hemostasis and thrombosis*, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1967

52. HAYEM G.
De la crise hématique, dans les maladies aiguës à débuts brusques.
C.R.Acad.Sci. 94, 200-202, 1882 a
53. HAYEM G.
Sur le mécanisme de l'arrêt des hémorrhagies.
C.R.Acad.Sci. 95, 18-21, 1882 b
54. HAYEM G.
Recherches sur l'évolution des hématies dans le sang de l'homme et des vertébrés.
Arch.Physiol Ser. 2/5, Année 12, 692-734, 1878
55. HELLEM A.J.
The adhesiveness of human blood platelets in vitro.
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 12/6, Suppl. 51, 1-117, 1960
56. HOLMSEN H.
Collagen-induced release of adenosine diphosphate from blood platelets incubated with radioactive phosphate in vitro.
Scand.J.Clin.Invest. 17/3, 239-246, 1965
57. HOLMSEN H., DAY J., STORM E.
Adenosine nucleotide metabolism of blood platelets. VI. Subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction.
Biochim.Biophys. 186/2, 254-266, 1969
58. HOVIG T.
Aggregation of rabbit blood platelets produced in vitro by saline "extract" of tendons.
Thromb.Diath.Haemorrh. 9, 248-263, 1963
59. HOVIG T.
The effect of various enzymes on the ultrastructure, aggregation, and clot retraction ability of rabbit blood platelets.
Thromb.Diath.Haemorrh. 13, 84-113, 1965
60. HOVIG T., HOLMSEN H.
Release of platelet-aggregating substance (adenosine diphosphate) from rabbit blood platelets induced by saline "Extract" of tendons.
Thromb.Diath.Haemorrh. 9, 264-278, 1963
61. HOVIG T., JØRGENSEN L., PACKHAM M.A., MUSTARD J.F.
Platelet adherence to fibrin and collagen.
J.Lab.Clin.Med. 71/1, 29-40, 1968

62. HUGUES J.
Accolement des plaquettes au collagène.
C.R. Soc. Biol. 154/1, 866-868, 1960
63. HUGUES J.
Some remarks concerning platelet aggregation induced by collagen.
Exp. Biol. Med. 3, 145-154, 1968
64. LATRIDIS P.G., FERGUSON J.H.
The plasmatic atmosphere of blood platelets. Evidence that only fibrinogen, AcG, and activated Hageman-Facotor are present on the surface of platelets.
Thromb. Diath. Haemorrh. 13, 114-125, 1965
65. JACOBSSON B.
Platelet adhesion and aggregation following contact between blood and vascular catheters in vitro.
Scand. J. Haemat. 6, 216-220, 1969
66. JAKES L.B.
Selection of surfaces for needles, syringes, collection sets, containers and test tubes to be used in clotting studies. S. 3 - 6 in: The coagulation of blood. Methods of study.
Tocantins L.M. (hrsg.) Grune u. Stratton, New York, London 1955.
67. JEAN G., RACINE L., GAUTIER A., MARX R.
Granulations denses anormales dans les thrombocytes humains
Thromb. Diath. Haemorrh. Vol. 10, 42 - 60, 1963
68. JERUSHALMY Z., ZUCKER M.B.
Some effects of fibrinogen degradation products (FDP) on blood platelets.
Thromb. Diath. Haemorrh. 15/3, 4, 413-419, 1966
69. JOHNSON S.A., STURROCK R.M., REBUCK J.W.
Morphological location of platelet factor 3 activity in normal platelets. S. 105-111
in: Blood clotting factors, Proc. IV. Internat. Congress of Biochem. Vol X, Hrsg.: Deutsch E., New York, Pergamon 1959
70. JONES O.P.
Origin of megakaryocyte granules from golgi vesicles.
Anat. Rec. 138/2, 105-110, 1960

71. KJARHEIM A., HOVIG T.
The ultrastructure of hemostatic blood platelet plugs in rabbit mesenterium.
Thromb. Diath. Haemorrh. 7, 1-15, 1962
72. KLINE D.L.
Chemistry and biochemistry of the fibrinolytic system.
Fed. Proc. 25, 31-33, 1966
73. KOPEC M., BUDZYNSKI A.Z., LATALLO Z.S., LIPINSKI B., STACHURSKA J., WEGRZYNOWICZ Z., KOWALSKI E.
Interaction of platelets and fibrinogen degradation products in hemostasis. S. 147-159
in: Kowalski E., Niewiarowski S.: Biochemistry of blood platelets. Academic Press, London u. New York, 1967
74. KOWALSKI E., KOPEC M., WEGRZYNOWICZ Z.
Influence of fibrinogen degradation products (FDP) on platelet aggregation, adhesiveness and viscous metamorphosis.
Thromb. Diath. Haemorrh. 10, 406-423, 1964
75. KOWALSKI E., KOPEC M., WEGRZYNOWICZ Z., HURWIC M., BUDZYNSKI A.Z.
A lysosomal concept of the platelet release reaction and viscous metamorphosis.
Thromb. Diath. Haemorrh. 16, 134-152, 1966
76. KRANE S.M., GLIMCHER M.J.
Studies on the interactions of collagen and phosphate. II. Nucleotidase activity and binding of nucleotide phosphorus. S. 419-441
in: Radioisotopes and Bone Hrsg.: Lacroix P., Budy A.M., Philadelphia, F.A. Davis Co., 1962
77. LAKER C.
Die Blutscheibchen sind constante Formelemente des normal circulierenden Säugethierblutes.
Virch. Arch. f. pathol. Anat. 116, 28-84, 1889
78. LAPIERE Ch.
Remaniements du tissu conjonctif.
Arscia-Maloine, Paris, 1965
79. LEGRAND Y., CAEN J.P., ROBERT L.
Effect of glucosamine on platelet-collagen reaction.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127/3, 941-943, 1968

80. LIBANSKA J.
Ultrastructure of human blood platelets during clotting process
in vitro. S. 61-79
in: Biochemistry of blood platelets, Hrsg.: Kowalski E., Nie-
wiarowski S.; Academic Press, London u. New York, 1967
81. LODER P.B., HIRSH J., DeGRUCHY G.C.
The effect of collagen on platelet glycolysis and nucleotide
metabolism.
Brit. J. Haematol. 14/6, 563-573, 1968
82. LUBARSCH O.
Über die Phagozytose und Phagozyten.
Klin. Wschr. 4, 1248-1250, 1925
83. LÜSCHER E.F.
Some thoughts on recent trends in platelet research.
Coagulation 1/3, 207-209, 1968
84. MANNUCCI P.M., SIRIGU F.
Effect of inhibitors of aggregation on platelet ultrastructure in
vitro.
Thromb. Diath. Haemorrh. 21/2, 354-361, 1969
85. MARCUS A.J., ZUCKER-FRANKLIN D., SAFIER L.G.,
ULLMAN H.L.
Studies on human platelet granules and membranes.
J. Clin. Invest. 45/1, 14-27, 1966
86. MARKWARDT F.
Studies on the release of biogenic amines from blood platelets.
S. 105 - 114
in: Biochemistry of blood platelets, Hrsg.: Kowalski E., Nie-
wiarowski S., Academic Press, London u. New York, 1967
87. MASON R.G., SABA S.R.
Platelet ATPase activities. I. Ecto-ATPase of intact platelets
and their possible role in aggregation.
Amer. J. Path. 55/2, 215-223, 1969
88. MICHAELIS L.
Der Acetat-Veronal Puffer
Biochem. Ztschr. 234, 139-141, 1931
89. MILLS D.C.B., ROBERTS G.C.K.
Membrane active drugs and the aggregation of human blood
platelets.
Nature 213, 35-38, 1967

90. MOLINAS F., von KAULLA K.N.
On the effect on human thrombocytes of synthetic organic
fibrinolytic compounds.
Thromb. Diath. Haemorrh. 21, 46-64, 1969
91. MORE R.H., HAUST M.D.
The role of thrombosis in occlusive disease of coronary
arteries. S. 143-153
in: Anticoagulants and fibrinolysins.
Hrsg.: MacMillan R.L., Mustard J.F.
Lea & Febiger, Philadelphia, 1961
92. MORGAN A.D.
The pathogenesis of coronary occlusion.
Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1956
93. MURPHY E.A., DOWNIE H.G., ROWSELL H.C.,
MUSTARD J.F.
The effects of dicumarol and heparin therapy on Platelet ec-
monny. The relationship of these changes to thrombus formation.
S. 68 - 76
in: Anticoagulants and fibrinolysins.
Hrsg.: MacMillan R.L., Mustard J.F.
Lea u. Febiger, Philadelphia 1961
94. MÜRER E.H.
Release reaction and energy metabolism in blood platelets with
special reference to the burst in oxygen uptake.
Biochim. Biophys. Acta 162/3, 320-326, 1968
95. MUSTARD J.F., DOWNIE H.G., MURPHY E.A.,
ROSWELL H.C.
Lipids, platelets and atherosclerosis. S. 191-204
in: Blood Platelets, 10th International Symposium, Henry Ford
Hosp. Detroit, 1960
Hrsg.: Johnson S.A., Monto R.W., Rebuck J.W., Horn Jr. R.C.
Puth, Littlejohn, Boston, 1961
96. MUSTARD J.F., HEGARDT B., ROSWELL H.C.,
MacMILLAN R.L.
Effect of adenosine nucleotides on platelet aggregation and
clotting time.
J. Lab. Clin. Med. 64/4, 548-559, 1964

97. MUSTARD J.F., GLYNN M.F., HOVIG T., JØRGENSEN L., PACKHAM M.A., NISHIZAWA E., ROWSELL H.C.
Platelets, blood coagulation and thrombosis. S. 288-326
in: Physiology of hemostasis and thrombosis.
Hrsg.: Johnson, S.A., Seegers W.H.
C.C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1967
98. NACHMAN R.L.
Platelet proteins
Sem. in Hematol. 5/1, S. 18-31, 1968
99. NIEWIAROWSKI S., BANKOWSKI E., ROGOWICKA I.
Studies on the absorption and activation of the Hageman factor
(factor XII) by collagen and elastin.
Thromb. Diath. Haemorrh. 14, 387-400, 1965
100. NIEWIAROWSKI S., THOMAS D.P.
Platelet aggregation by ADP and thrombin
Nature 212, 1544, 1547, 1966
101. NIEWIAROWSKI S., FARBISZEWSKI R., POPLAWSKI A.,
LIPINSKI B.
Further investigations on the role of platelet factor 4 (PF 4)
in the mechanism of platelet aggregation. 314-317
in: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten
und Thrombozyten. I. Internationales Symposium, Wien, 1968
Hrsg.: Deutsch E., Gerlach E., Moser K.
G. Thieme Verlag, 1968
102. NIEWIAROWSKI S., POPLAWSKI A., LIPINSKI B.,
FARBISZEWSKI R.
The release of platelet clotting factors during aggregation and
viscous metamorphosis. 121-128
Exp. Biol. Med. Nr. 3, 1968
103. NILSSON I.M., BLOMBÄCK M., JORPES E., BLOMBÄCK
B., JOHANSSON S.A.
von Millebrand's disease and its correction with human
plasma fraction 1-0
Acta Med. Scand. 159/3, 179-188, 1957
104. NISHIZAWA E.E., HOVIG T., LOTZ F., ROWSELL H.C.,
MUSTARD J.F.
Effect of a natural phosphatidyl serine fraction on blood coagu-
lation, platelet aggregation and hemostasis.
Brit. J. Haematol. 16/5, 487-499, 1969

105. NORMAN P.S.
Studies of the plasmin system
II. Inhibition of plasmin by serum or plasma
J. Exper. Med. 108/1, 53 - 68, 1958
106. NOSSEL H.L., WILNER G.D., LeROY E.C.
Importance of polar groups for initiating blood coagulation and aggregating platelets.
Nature 221, 75-76, 1969
107. O'BRIEN J.R.
Effect of anti-inflammatory agents on platelets.
Lancet II, 894-895, 1969
108. O'BRIEN J.R.
Further observations on platelet aggregation induced by adenosine diphosphate, thrombin and triethyltin.
J. Clin. Path. 16, 223-230, 1963
109. O'BRIEN J.R., HEYWOOD J.B., HEADY J.A.
The quantitation of platelet aggregation induced by four compounds: A study in relation to myocardial infarction.
Thromb. Diath. Haemorrh. 16/3, 4, 752-767, 1966
110. O'BRIEN J.R., HEYWOOD J.B.
Effect of aggregating agents and their inhibitors on the mean platelet shape.
J. Clin. Path. 19, 148-153, 1966
111. O'BRIEN J.R., SHOOBRIDGE S.M., FINCH W.
Comparison of the effect of heparin and citrate on platelet aggregation.
J. Clin. Path. 22/1, 28-31, 1969
112. OGATA S.
Untersuchungen über die Herkunft der Blutplättchen.
Beitr. z. pathol. Anat. 52/1, 192-201, 1912
113. OSLER W.
An account of certain organisms occurring in the liquor sanguinis.
Rec. Roy. Soc. Med. 22, 391-398, 1874
114. PACKHAM M.A., WARRIOR E.S., GLYNN M.F.
Alteration of the response of platelets to surface stimuli by pyrazole compounds.
J. Exp. Med. 126/1, 171-188, 1967

115. PIZZUTO J., GIORGIO A.J., DIDISHEIM P.
The clot-promoting effect of adenosine-5'-diphosphate (ADP).
I. Mechanism of action.
Thromb.Diath.Haemorrh. 15/3, 4, 428-435, 1966
116. POLLER L.
Recent advances in blood coagulation.
Little, Brown, and comp., Boston, 1969
117. POOLE J.C.F., FRENCH J.E.
Thrombosis
J.Atheroscler.Res. 1, 251-282, 1961
118. PUSZKIN E., JERUSHALMY Z.
Effect of connective tissue and collagen on platelet lactate production: Role of acid mucopolysaacharides.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 129/2, 346-351, 1968
119. RANVIER M.
Du mode de formation de la fibrine dans le sang extrait des vaisseaux.
C.R.Soc.Biol. 5, 46-49, 1873
120. REUTER H., NIEMEYER G., GROSS R.
Zur Differenzierung der Plättchenaggregation. S. 335-341
in: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrozyten und Thrombozyten. I. Internationales Symposium, Wien 1968, Hrsg.: Deutsch E., Gerlach E., Moser K.
G. Thieme Verlag 1968
121. REYNOLDS E.S.
The use of lead citrate at high pH. as an electronopaque stain in electron microscopy.
J.Cell.Biol. 17, 208-212, 1963
122. ROBB-SMITH A.H.T.
Why platelets were discovered.
Brit.J.Haematol. 13/4, 618-637, 1967
123. ROBINSON C.W., KRESS S.C., WAGNER R.H.,
BRINKHOUSE K.M.
Platelet aggentination and deaggentination with a sulfhydryl inhibitor, methyl inercuric nitrate: relationsships to platelet ATPase.
Exp.Molec.Path. 4, 457-464, 1965

124. ROSKAN J.
Contribution a l'étude de la physiologie normale et pathologique
du globulin (plaquette de BIZZOZERO).
Arch.Int.Physiol. 20/3, 241-330, 1923
125. SALMON J.
Absorption de protéines par les plaquettes sanguines.
Experientia 16/1, 26-27, 1960
126. SALZMAN E.W., CHAMBERS D.A., NERI L.L.
Possible mechanism of aggregation of blood platelets by adeno-
sine diphosphate.
Nature 210, 167-169, 1966
127. SCHULTZE M.
Ein heizbarer Objektisch und seine Verwendung bei Untersu-
chungen des Blutes.
Arch.Mikros.Anat 1, 1-42, 1865
128. SCHULZ H., JÜRGENS R., HIEPLER E.
Die Ultrastructur der Thrombozyten bei der konstitutionellen
Thrombopathie (von Willebrand-Jürgens) mit einem Beitrag
zur submikroskopischen Ätiologie der Thrombozyten.
Thromb.Diath.Haemorrh. 2, 300-323, 1958
129. SEELIGER S.
Über die Plättchenerzeugung und Phagozytose als Funktion der
Knochenmarksriesenzellen.
Folia Haemat. 29/1, 23-33, 1923
130. SHERRY S., FLETSCHER A.P., ALKJAERSIG N.
Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man.
Physiol.Rev. 39/2, 343-382, 1959
131. SINAKOS Z., CAEN J.
Une technique simple, quantitative de mesure de l'agrégation
plaquettaire.
Rev.Franc.Etud.Clin.et Biol. 11/5, 539-541, 1966
132. SINAKOS Z., CAEN J.
Agrégabilité des plaquettes de diverses espèces animales
(Étude microscopique et photométrique)
Nouv.Rev.Franc.Hemat. 7/1, 120-124, 1967
133. SKOZA L., ZUCKER M.B., JERUSHALMY Z., GRANT R.
Kinetic studies of platelet aggregation induced by adenosine
diphosphate and its inhibition by chelating agents, guanidino
compounds and adenosine.
Thromb.Diath.Haemorrh. 18/3, 4, 713-735, 1967

134. SMINK D.A., KRUISHEER H.E.J., BÖTTCHER C.J.F.
Physico-chemical interaction between adenosine phosphate and
fibrinogen as a cause of platelet aggregation
Nature 217, 374-376, 1967
135. SOKAL R.R., ROHLF F.J.
Biometry
W.H. Freeman and Comp., San Francisco, 1969
136. SOLUM N.O.
Aggregation of human platelets by bovine platelet-fibrinogen,
Sacnd. J. Haematol. 5/6, 474-485, 1968
137. SOLUM N.O., STORMORKEN H.
Influence of fibrinogen in the aggregation of washed human blood
platelets induced by adenosine diphosphate, thrombin, collagen
and adrenaline.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 17, Suppl. 84, 170-182, 1965
138. SPAET T.H., CINTRON J., SPIVACK M.
Some properties of the platelet-connective tissue mixed agglu-
tination reaction,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111/2, 292-295, 1962
139. SPAET T.H., CINTRON J.
Studies on platelet factor 3 availability.
Information Exchange Group Nr. 2/13, Nct. Inst. of Health,
Bethesda, 1964
140. SPAET T.H., ZUCKER M.B.
Mechanism of platelet plug formation and role of adenosine
diphosphate.
Amer. J. Physiol 206/6, 1267-1274, 1964
141. SPAET T.H., ERICHSON R.B.
The vascular wall in the pathogenesis of thrombosis.
Thromb. Diath. Haemorrh. 21, Suppl. 21, 67-86, 1966
142. SPAET T.H., LEJNIEKS I.
Studies on the mechanism whereby platelets are clumped
adenosine-diphosphate.
Thromb. Diath. Haemorrh. 15/1, 36-51, 1966
143. STORMORKEN H.
The defect in von Willebrand's disease. S. 179-200
in: *Physiology of hemostasis and thrombosis.*
Hrsg.: Johnson S.A., Seegers W.H.
C.C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA, 1967

144. THILO D., von KAULLA K.N.
Structure-dependent inhibition by synthetic fibrinolytic anions
of collagen-induced aggregation of human platelets.
J. Medicinal Chemistry 13/3, 503-510, 1970
145. THOMAS D.P.
The role of platelet catecholamines in the aggregation of platelets by collagen and thrombin.
Exp. Biol. Med. Nr. 3, 129-134, 1968
146. TOCANTINS L.M.
Historical notes on blood platelets.
Blood 3/10, 1073-1082, 1948
147. TODD A.S.
The histological localisation of fibrinolytic activator.
J. path. Bact. 78/1, 281-283, 1959
148. von KAULLA K.N.
Chemistry of thrombolysis: human fibrinolytic enzymes.
C.C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1963
149. von KAULLA K.N.
A simple test tube arrangement for screening fibrinolytic activity of synthetic organic compounds.
J. Medicinal Chemistry 8, 164-166, 1965
150. von KAULLA K.N.
Synthetische Fibrinolytika.
Thromb. Diath. Haemorrh. Suppl. 32, 63-91, 1969
151. von KAULLA K.N., LEPPKE L.
Models in studies of synthetic organic fibrinolytic agents.
S. 200-211
in: Dynamics of thrombus formation and dissolution.
Hrsg.: Johnson S.A., Guest M.M.
J.B. Lippincott Comp. Philadelphia, Toronto, 1969
152. von KAULLA K.N., THILO D.
Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation menschlicher Thrombozyten durch Phenylderivate der 4-Aminothiophen-3-carbonsäure, einer neuen Gruppe synthetischer Fibrinolytika.
Klin. Wschr. 11, 668-673, 1970
153. von KAULLA K.N., THILO D.
Inhibition of platelet aggregation by synthetic fibrinolytic agents.
Thromb. Diath. Haemorrh. 1971 (im Druck)

154. WATSON M.L.
Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals.
J. Biophys. Biochme. Cytol. 4/4, 475-478, 1958
155. WEIL M.H., SHUBIN H., BIDDLE M.
Shock caused by gram- negative micro organisms.
Ann.intern.Med 60, 384-400, 1964
156. WEISS H.J., ALEDORT L.M., KOCHWA S.
The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man.
J.Clin.Invest. 47/2, 2169-2180, 1968
157. WHITE J.G., KRIVIT W.
Fine structural localisation of adenosine triphosphatase in human platelets and other blood cells.
Blood 26/5, 554-568, 1965
158. WILNER G.D., NOSSEL H.L., LeROY E.C.
Aggregation of platelets by collagen.
J.Clin.Invest. 47/3, 2616-2621, 1968
159. WILSON P.A., McNICOL G.P., DOUGLAS A.S.
Some effects of trypsin and streptokinase on platelet aggregation.
Thromb.Diath.Haemorrh. 18, 66-75, 1967
160. WOLPERS C., RUSKA H.
Strukturuntersuchungen zur Blutgerinnung.
Klin. Wschr. 18, 1077-1081, 1111-1117, 1939
161. WRIGHT J.H.
The origin and nature of the blood plates.
Boston Med.Surg.J. 154/23, 643-645, 1906
162. ZAHN F.W.
Untersuchungen über Thrombose; Bildung der Thromben.
Virch.Arch.f.pathol.Anat. 62/1, 81-124, 1875
163. ZUCKER M.B.
Platelet agglutination and vasoconstriction as factors in spontaneous hemostasis in normal, thrombocytopenic, heparinized and hypoprothrombinemic rats.
Amer.J.Physiol. 148/2, 275-288, 1947

164. ZUCKER M.B., BORRELI J.
Platelets clumping produced by connective tissue suspension
and by collagen.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 109/5, 779-787, 1962
165. ZUCKER M.B., JERUSHALMY Z.
Studies on the platelet shape and aggregation; effect of inhibi-
tors and these and other platelet characteristics. S. 249-265
in: Physiology of hemostasis and thrombosis.
Hrsg.: Johnsen S.A., Seegers W.H., Thomas C.C., Spring-
field, Illinois, USA, 1967
166. ZUCKER M.B., PETERSON J.
Inhibition of adenosine diphosphate-induced secondary aggre-
gation and other platelet functions by acetylsali cylic acid
ingestions.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 127/2, 547-551, 1968

LEBENS LAUF

Am 21. 8. 1945 wurde ich, Detlev G. S. Thilo, als Sohn des gefallenen Oberpostrates Dipl. Ing. Günther Thilo und seiner Ehefrau Gabriele geb. Pawlikowski de Cholewa in Erlangen geboren.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Volksschule und von 1956 bis 1965 die Ohm-Oberrealschule in Erlangen, die ich am 20. 7. 1965 mit dem Abitur abschloß.

Vom 1. 8. 1963 bis 31. 8. 1964 war ich Stipendiat an der Oberschule in Homer, New York, USA.

1965 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander Universität, Erlangen, in die Medizinische und im Sommersemester 1968 in die Philosophische Fakultät. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich am 11. 3. 1968.

Im Sommersemester 1968 erhielt ich von der Universität Erlangen ein Forschungsjahresstipendium zu Professor Dr. med. K. N. von Kaulla am Medical Center der Universität von Colorado, Denver, USA.

März 1970 wurde ich in die Studienstiftung des Deutschen Volkes aufgenommen.

Das medizinische Staatsexamen lege ich im Juni 1971 in Erlangen ab.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hög, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990